

Hydrogénobactéries des milieux géothermiques et volcaniques : taxonomie et écologie

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Hydrogénobactéries des milieux géothermiques
et volcaniques: taxonomie et écologie

de Mademoiselle Fabienne Bonjour

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

MM. les professeurs M. Aragno, Ph. Küpfer,
B. Schink (Tübingen) et G. Marinelli (Pise)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 21 juillet 1988

Le doyen:



F. Persoz

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très vivement toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail, en particulier:

- Le Professeur Michel Aragno qui a toujours montré un très vif intérêt pour cette recherche et m'a constamment encouragés et conseillée.
- Le Professeur Giorgio Marinelli pour ces remarques précieuses sur la géologie et le chimisme des milieux étudiés et ses conseils lors de la rédaction du manuscrit.
- Les Professeurs Bertrami, Kübler, Conrad et Porsella ainsi le Docteur Maire pour leur assistance lors d'analyses spécifiques.
- Le Professeur Taddei qui nous a guidée et conseillée lors de la campagne d'échantillonnage effectuée dans la région de Naples.
- Le Docteur Bernard Jenni pour ses nombreux conseils et suggestions.
- Mmes Schneider et Lavanchy, Mlles Merti et Ducros pour leur assistance technique.
- Les collaborateurs du laboratoire de microbiologie pour l'ambiance amicale qu'ils ont su créer sur le lieu de travail et les nombreuses discussions souvent constructives que nous avons eues ensemble.

- P.Kaelin, R.Lienhart et A.Grabner dont les résultats des travaux de licence m'ont été précieux.
- Ma sœur Isabelle qui a tapé (et retapé!) les légendes des figures et des photos ainsi que les tableaux.

Je tiens également à remercier mes parents, à qui je dédie cette thèse, pour la confiance et la compréhension qu'ils n'ont cessé de me témoigner pendant tout ce travail et bien au-delà.

TABLE DES MATIERES

PAGE

REMERCIEMENTS

I	INTRODUCTION	1
II	LA THERMOPHILIE	8
	1. Quelques considérations sur les environnements extrêmes	8
	2. Les organismes thermophiles	10
	2.1. Classification	10
	3. Limites de température	12
	4. Bases moléculaires de la thermophilie	16
	5. Origine des organismes thermophiles	19
	6. Habitats	21
III	MATERIEL ET METHODES	23
	1. Caractérisation du milieu naturel	23
	1.1. Mesure du pH et de la température	23
	1.2. Analyses des composants chimiques et des gaz	23
	1.3. Analyse des gaz dissous et consommation d'hydrogène	23
	1.4. Analyses minéralogiques	24
	1.5. Détermination du carbone organique	24
	1.6. Mesure de la concentration en ATP	25
	2. Milieux de culture	25
	2.1. Milieu minéral de base (MMB)	25
	2.2. MMB modifié	25

2.3.	Milieu pour <u>Bacillus tusciae</u>	26
2.4.	Milieus complexes	26
2.5.	Milieus solides	26
3.	Méthodes d'enrichissement et de purification	26
3.1.	Prélèvement	26
3.2.	Enrichissement	27
3.3.	Purification	27
3.4.	Conditions d'incubation	28
3.5.	Numération	28
4.	Caractérisation	28
4.1.	Cultures "batch"	28
4.2.	Croissance en fermenteur	29
4.3.	Mesure de la densité optique	29
4.4.	Concentration en protéines	29
4.5.	Températures cardinales	29
4.6.	pH optimal	30
5.	Caractéristiques nutritionnelles	30
5.1.	Sources de carbone	30
5.2.	Sources d'azote	31
5.3.	Fixation d'azote moléculaire	31
5.3.1.	Test préemptif	31
5.3.2.	Test de réduction de l'acétylène	31
6.	Utilisation de composés réduits du soufre	32
6.1.	Test de croissance	32
6.2.	Dosage du thiosulfate	33
6.3.	Dosage du sulfate	33
6.4.	Croissance mixolithotrophe	33
7.	Tests biochimiques	34
7.1.	Hydrolyse de l'amidon	34
7.2.	Tolérance à la glycine et au NaCl	34
7.3.	Utilisation des nitrates	34
7.4.	Tests de la catalase et de l'oxydase	34
7.5.	Sensibilité à la pénicilline	35
7.6.	Poly β hydroxybutyrate (PHB)	35
8.	Tests enzymatiques	35
8.1.	Préparation de fractions subcellulaires	35
8.2.	Activité de l'hydrogénase	36
8.2.1.	Activité en fonction de la température	36

8.2.2. Localisation	36
8.3. Activité de la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase	36
8.4. Activité de la phosphoribulokinase	37
8.5. Activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase	39
9. Ultrastructure	39
9.1. Coloration négative	40
9.2. Coupes fines	40
9.3. Préparation des parois	40
10. Caractérisation du génome	41
11. Analyse des données	41
12. Conservation des souches	42
13. Liste des abréviations	42
 IV LES MILIEUX GEOTHERMAUX ET VOLCANIQUES	 43
1. La région géothermale de Larderello	46
1.1. Historique	46
1.2. Géologie	47
1.3. San Federigo	48
1.4. Description des points d'échantillonnage	49
1.5. Chimisme	51
1.6. Minéralogie	53
1.7. Analyse des gaz	54
1.8. Carbone organique	57
1.9. Consommation d'hydrogène	58
1.10. Quantification des hydrogénobactéries	60
1.11. Mesure de l'ATP	62
1.12. Enrichissement	63
2. Autres régions géothermales/volcaniques	65
2.1. Région de Naples	65
2.2. Vésuve	66
2.3. Etna	66
2.4. Les Iles Eoliennes (Vulcano)	66
2.5. Islande	67
3. Bilan	68

A) Resultats	71
1. Souches étudiées	71
2. Pourcentage guanine + cytosine	71
3. Pourcentages d'homologie ADN-ADN	72
4. Morphologie	73
5. Ultrastructure	74
6. Culture en milieu liquide non agité	74
7. Croissance en fermenteur, taux de croissance	75
8. Culture en milieu solide	75
9. Températures cardinales	77
10. Optimum de pH	77
11. Tolérance à divers composés	78
11.1. Tolérance au NaCl et à la glycine	78
11.2. Tolérance au borate	78
11.3. Sensibilité à la pénicilline	79
12. Sources d'azote	79
12.1. Sources d'azote combiné	79
12.2. Fixation d'azote	80
13. Sources de carbons	80
14. Sulfoxydation	81
14.1. Croissance avec des composés réduits du soufre	81
14.2. Analyse de la croissance avec thiosulfate	82
14.3. Croissance mixolithotrophe	84
14.4. Applications de la mixolithotrophie	85
15. Caractérisation enzymatique	85
15.1. Activité de l'hydrogénase	85
15.1.1 Activité en fonction de la température	86
15.1.2. Localisation	86
15.2. Activité de la RUBP carboxylase	87
15.3. Activité de la phosphoribulokinase	88
15.4. Activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase	88
16. La souche MF3	88

B) Discussion	91
1. L'autotrophie obligatoire	91
1.1. Définition	91
1.2. Causes de l'autotrophie obligatoire	93
1.3. Aspects écologiques	96
1.4. Le cas des <u>Hydrogenobacter</u>	98
1.5. Le cas de MF3, souche facultativement autotrophe	99
1.6. Existence d'autres hydrogénobactéries autotrophes obligatoires	103
2. La fixation du CO ₂	105
2.1. Les trois voies de fixation du CO ₂	106
2.1.1. Le cycle de Calvin	106
2.1.2. La voie de l'acétyl CoA	106
2.1.3. Cycle réductif de l'acide citrique	108
2.2. Fixation du CO ₂ chez les <u>Hydrogenobacter</u>	109
3. Le métabolisme des composés réduits du soufre	110
3.1. Mécanisme d'oxydation du thiosulfate	111
3.2. L'oxydation du thiosulfate chez les <u>Hydrogenobacter</u>	113
3.2.1. Estimation du rendement de croissance	114
3.2.2. Variation du taux de croissance	115
3.2.3. Mixolithotrophie	116
4. Relations avec l'oxygène	117
5. Considérations taxonomiques et évolutives	119
5.1. Remarques sur la taxonomie bactérienne	119
5.2. Taxonomie du genre <u>Hydrogenobacter</u>	121
5.3. Description du genre <u>Hydrogenobacter</u>	124
5.4. Position taxonomique du genre <u>Hydrogenobacter</u>	126
5.4.1. Quelques notions sur l'évolution bactérienne	126
5.4.2. Phylogénie des <u>Hydrogenobacter</u>	129

VI	HYDROGENOBACTERIES THERMOPHILES SPORULANTES	133
A)	Résultats	137
1.	<u>Bacillus tusciae</u>	137
1.1.	Isolement	137
1.2.	Morphologie	137
1.3.	Caractéristiques des cultures	138
1.4.	Caractéristiques de croissance	138
1.5.	Caractéristiques nutritionnelles	139
1.5.1.	Sources de carbone	139
1.5.2.	Sources d'azote	140
1.5.3.	Utilisation des composés réduits du soufre	140
1.6.	Caractéristiques biochimiques	140
1.7.	Enzymes de l'autotrophie	141
1.8.	Lipides	142
1.9.	Caractérisation génétique	143
1.10.	Position taxonomique	143
1.11.	Description de l'espèce	144
2.	<u>Bacillus schlegelii</u>	145
2.1.	Isolement de <u>B. schlegelii</u> de milieux à basse température	147
2.2.	Incubation de sédiment lacustre à basse température	147
2.3.	Isolement à partir de milieux géothermaux	148
2.3.1.	Caractérisation phéno et génotypique	149
B)	Discussion	150
1.	"Ecologie de <u>Bacillus tusciae</u>	150
2.	"Ecologie de <u>Bacillus schlegelii</u>	151
3.	Quelques remarques sur la thermophilie des <u>Bacillus</u>	152

VII CONCLUSIONS	155
VIII BIBLIOGRAPHIE	162
ANNEXE: TABLEAUX, FIGURES ET PHOTOS	186

I INTRODUCTION

Le groupe des hydrogénobactéries est défini sur la base de la capacité physiologique à utiliser l'hydrogène comme donneur d'électrons et le gaz carbonique comme source de carbone, en conditions aérobies. Ce sont donc des chimioolithoautotrophes. Ces hydrogénobactéries - sensu stricto - sont différentes des bactéries qui peuvent utiliser l'hydrogène en conditions aérobies mais sans fixer le CO₂ (Azotobacter, Entérobacteriacées...). Elles diffèrent également des bactéries qui utilisent l'hydrogène en conditions anaérobies avec le sulfate ou le CO₂ comme accepteur d'électrons (Desulfovibrio, Clostridium acetium, Acetobacterium woodi, Methanobacterium thermoautotrophicum...).

À l'origine, les hydrogénobactéries ont été regroupées dans le genre Hydrogenomonas. Avec la description d'un nombre croissant de souches, il est apparu que ce groupe était hétérogène et que, dans la plupart des cas, les espèces individuelles devaient être placées dans des genres préexistants de bactéries hétérotrophes (Pseudomonas, Alcaligenes, Aquaspirillum etc.). Le genre Hydrogenomonas a donc dû être rejeté (Davies et al. 1969). Des études morphologiques (Aragno et al. 1977, Walther-Maruechat et al. 1977) ainsi que l'isolement d'hydrogénobactéries appartenant à d'autres groupes taxonomiques ont confirmé cette diversité. Les dernières monographies parues sur les hydrogénobactéries sont celles d'Aragno et Schlegel (1981) - taxonomie et écologie - et de Bowien et Schlegel (1981) - physiologie -.

Les hydrogénobactéries sont donc, taxonomiquement, un groupe plus dispersé et moins spécialisé que les autres groupes de bactéries lithotrophes: bactéries nitrifiantes, ferro et sulfoxydantes. Elles s'en distinguent également par l'absence de systèmes de membranes internes (adaptation structurelle à la vie autotrophe)

ainsi que par leur développement de préférence hétérotrophe. Les hydrogénobactéries sont des autotrophes facultatifs dont la croissance est généralement meilleure sur des composés organiques (Rittenberg 1969). On ne connaissait pas dans ce groupe d'autotrophes obligatoires. De plus, alors que les donneurs inorganiques d'électrons sont généralement disponibles en quantité appréciable, l'hydrogène semble n'être présent qu'à l'état de traces dans la plupart des environnements naturels. Il ne peut pourtant être utilisé qu'au-dessus d'un seuil de concentration valant de 1-10 nM pour la plupart des souches étudiées (Conrad et al. 1983a), soit plus que la concentration en hydrogène mesurée dans les sols et les eaux ou en équilibre avec l'atmosphère (Conrad et Seiler 1979, Conrad et al. 1983b).

Sur la base de ces constatations, l'utilisation aérobie de l'hydrogène apparaît comme un phénomène peu fondamental. Cependant, l'expression de ce métabolisme chez des bactéries aussi diverses implique nécessairement que celui-ci a une signification réelle dans certaines conditions: il convient donc de chercher lesquelles.

Il existe au moins deux types de situations où l'utilisation de l'hydrogène s'avère significative: lors de la croissance en conditions mixotrophes et dans les - rares - milieux riches en hydrogène.

- Croissance en conditions mixotrophes

De nombreuses bactéries sont capables d'utiliser de manière conjointe une source de carbone organique et un donneur d'électrons inorganique; cette possibilité existe également chez les hydrogénobactéries (Rittenberg 1969). Les implications physiologiques de ce métabolisme (taux d'activités enzymatiques, régulations...) ont été étudiées de manière détaillée chez une hydrogénobactérie mésophile, Aquaspirillum autotrophicum (Fasnacht 1987). Quant à l'avantage écologique inhérent à un tel métabolisme, il a été mis en exergue a

plusieurs reprises (Gottschal et Kuenen, 1980a,b, Beudecker et al. 1982, Kuenen et Gottschal 1982, Kuenen et Robertson 1984 entre autres).

- Milieux riches en hydrogène

Les concentrations en hydrogène mesurées dans les sols et les eaux sont des valeurs moyennes, temporellement et géographiquement. Elles n'excluent ni l'existence de microenvironnements riches en hydrogène ni l'apparition transitoire de concentrations plus élevées.

On mesure p.ex. de fortes productions d'hydrogène dans les décharges où la matière organique est décomposée sous des conditions de diffusion restreinte d'oxygène (Gandolla et al. 1982, Gandolla et Grabner 1983, Glauser et al. 1987). La phase transitoire de dégagement d'hydrogène s'accompagne de la production de nombreux composés organiques volatils malodorants. Ces mauvaises odeurs peuvent être éliminées en déposant sur la décharge une couche de terre de 30-50 cm (Gandolla et al. 1986). Ce sol permet l'établissement d'une population de bactéries aérobies qui vont oxyder les produits volatils et les gaz, dont l'hydrogène, issus de la zone anaérobie sous-jacente. Dugnani et al. (1986) ont montré que dans ces conditions il y avait établissement d'une importante population d'hydrogénobactéries.

Les interfaces entre zones riches en oxygène et zones sans oxygène (zones oxygènes et anoxiques) apparaissent d'ailleurs, d'une façon générale, comme très propices au développement des hydrogénobactéries.

On observe également d'importants dégagements d'hydrogène au voisinage des fixateurs d'azote (Haystead et al. 1970). Ceux-ci possédant généralement des hydrogénases leur permettant de récupérer cet hydrogène. Cette récupération a le triple avantage d'empêcher une inhibition de la nitrogénase réductase par l'hydrogène, d'abaisser la concentration en oxygène au voisinage du fixateur et de fournir de l'énergie (Dixon 1972). De nombreux fixateurs d'azote sont cependant dépourvus

d'hydrogénase (Hup-) sans pour autant que l'on détecte de l'hydrogène à leur proximité (Schubert et Evans 1976, Uratsu et al. 1982). On peut supposer que l'hydrogène est consommé par des hydrogénobactéries qui établissent une relation syntrophique avec les fixateurs d'azote; symbiose comparable à celle qui s'établit en conditions anaérobies entre acétogènes et méthanogènes (Wolin et Miller 1982, Conrad et al. 1985b).

On constate donc que les hydrogénobactéries ont un effet indirect sur le bilan global de l'hydrogène; plutôt que de consommer les traces d'hydrogène présentes dans l'atmosphère, les sols ou les eaux, elles vont se développer à proximité immédiate de zones riches en hydrogène: particules en décomposition, interfaces entre zones oxygènes et anoxiques, fixateurs d'azote etc. Leur faculté de se développer en conditions mixotrophes leur permet d'utiliser au mieux ces apports transitoires ou/et localisés.

Récemment, on a pris conscience de l'existence d'un autre type d'environnement potentiellement favorable aux hydrogénobactéries: les milieux géothermaux. De par leur température élevée, ces environnements sont susceptibles de contenir d'importantes quantités d'hydrogène. A haute température en effet, l'hydrogène peut être produit de façon abiotique (D'Amore et Nuti 1977, Kite et al. 1982). On s'est d'ailleurs mesuré des teneurs en hydrogène de plusieurs pourcents dans divers sites géothermaux (Gunter et Muegrave 1966, Arnorsson et Gunnlaugsson 1985). Contrairement à ce que l'on observe dans les eaux ou les sols des régions tempérées, on a là des environnements permettant une croissance hydrogénotrophe en permanence. A priori, il s'agit donc d'un habitat possible pour des hydrogénobactéries. Cependant, diverses caractéristiques vont de pair avec cette richesse en hydrogène: hautes températures, pauvreté en matière organique, manque de diversité des niches écologiques, isolement géographique et nous ignorons l'impact de ces différents facteurs sur le développement des hydrogénobactéries.

L'existence d'hydrogénobactéries thermophiles est peu documentée. En 1982, les seules espèces décrites étaient: Pseudomonas thermophila, synonymie: Hydrogenomonas thermophilus (Mc Gee et al. 1967, Emnova et Zavarzin 1977), Pseudomonas hydrogenothermophila K2 (Goto et al. 1977, 1978), Flavobacterium autothermophilum (Goto et al. 1977, 1978) et Bacillus schlagelii (Schenk et Aragno 1979); cette dernière étant à notre connaissance la seule espèce homologuée! Ce Bacillus posait d'ailleurs un problème écologique puisque, malgré son optimum de température de 65°C, il n'avait été isolé que de milieux à basse température.

Cependant, la réalité d'une vie à haute température était déjà bien établie, surtout depuis les travaux de Brock qui a fait un véritable travail de pionnier, non seulement en isolant et décrivant plusieurs espèces de bactéries thermophiles, mais surtout en s'intéressant à leur écophysiologie. Depuis lors, l'intérêt pour les bactéries thermophiles ne s'est jamais démenti. La découverte du "règne" des Archéobactéries (Woese et Fox 1977, Woese et al. 1978, Fox et al. 1980) qui compte de nombreuses espèces thermophiles, l'étude de nouveaux environnements à haute température comme les "black-smokers" et autres manifestations hydrothermales sous-marines, le potentiel biotechnologique de tels organismes ont encore relancé cet intérêt. Des nombreuses études réalisées sur les organismes thermophiles nous permettent de conclure qu'il n'y avait aucun obstacle théorique à l'existence d'hydrogénobactéries thermophiles.

L'absence de carbone organique pouvait constituer un handicap plus sérieux. Nous avons vu que les hydrogénobactéries décrites jusqu'alors n'étaient que facultativement autotrophes et se développaient de préférence en conditions mixo- ou hétérotrophes. La question se posait de savoir s'il existait des hydrogénobactéries capables de s'adapter à un environnement, certes riche en hydrogène, mais très pauvre en matière organique. Le seul moyen d'y répondre était de tenter des isolations dans de tels milieux!

Notre problématique au début de ce travail était donc la suivante:

- Caractérisation des milieux géothermaux

Notre centre d'intérêt était bien entendu l'hydrogène: quantification, mesure de consommation etc. Par ailleurs, d'autres paramètres physicochimiques pouvant éclairer l'écologie des souches vivant dans de tels milieux ont également été analysés: teneur en matière organique, chimisme, température, pH... Il convenait aussi de quantifier l'importance des hydrogénobactéries dans de tels milieux ce que nous avons tenté d'estimer par des numérations.

- Isolement et caractérisation d'hydrogénobactéries

L'étude des milieux géothermaux ayant prouvé qu'ils constituaient des habitats potentiels pour les hydrogénobactéries, nous avons alors tenté d'en isoler des hydrogénobactéries thermophiles puis de les caractériser. Nous ne savions pas a priori quelles espèces étaient susceptibles de se développer dans de tels milieux. Sur la base de travaux effectués dans des environnements similaires par de nombreux chercheurs, nous pouvions cependant formuler quelques hypothèses:

- Isolement de souches thermophiles fortement apparentées à des espèces mésophiles déjà décrites. En quelque sorte, des "variants thermophiles", situation fréquemment rencontrée lors d'isolement de Bacillus thermophiles.

- Isolement de souche thermophiles hydrogénotrophes apparentées à des espèces hétérotrophes ou possédant un autre type de lithotrophie, soit des "variants hydrogénotrophes".

- Isolement de souches originales, sans lien direct avec des espèces déjà décrites, appartenant éventuellement au "régne" des Archéobactéries, vu l'abondante représentation de celui-ci dans de tels milieux.

Le travail de taxonomie réalisé sur les souches isolées devait nous permettre de tester le bien fondé de ces trois hypothèses.

- Mise en évidence de l'impact du milieu sur les caractéristiques physiologiques et phylogénétiques des souches isolées.
Dans les milieux géothermaux, les disponibilités relatives de la matière organique et de l'hydrogène sont à l'inverse de ce que l'on observe généralement. De quelle manière ce facteur influence-t-il la physiologie des hydrogénobactéries? Peut-on dans de tels milieux concevoir d'isoler des bactéries se développent de préférence en conditions hétérotrophes ou mixotrophes, comme c'est le cas habituellement? Par ailleurs, quel est l'effet de la température; la concentration en hydrogène dissous permet-elle une croissance hydrogénotrophe; l'utilisation de l'hydrogène reste-t-elle possible aux très hautes températures; Le cycle de Calvin est-il encore fonctionnel au-dessus de 70°C?

A ces nombreuses questions sur la physiologie s'ajoutent encore celles sur la phylogénie. Les milieux géothermaux exercent une forte pression de sélection sur les organismes qui y vivent. De plus, leur isolement géographique s'oppose à l'action de mécanismes d'évolution généralement très répandus dans le monde bactérien tel que le brassage génétique par échange horizontal de gènes. Dans ces conditions, quels sont les mécanismes de spéciation?

La réponse à ces questions dépasse le cadre de cette thèse, mais nous tenterons néanmoins d'apporter quelques éléments d'explication.

- Ecologie de Bacillus schlegelii
Incidentement, nous avons tenté de résoudre le problème de l'écologie de B. schlegelii en le recherchant systématiquement dans les milieux géothermaux qui, au vu des caractéristiques physiologiques de cette bactérie, apparaissent comme un type d'environnement plus adéquat que des sédiments froids!

II. LA THERMOPHILIE

Notre propos n'est pas de traiter de manière exhaustive tous les aspects de la thermophilie. Nous souhaitons seulement, dans ce chapitre, donner quelques informations de base sur la vie à haute température et les phénomènes qui y sont liés.

Seuls quelques points sont donc traités et cela superficiellement, mais ces données nous ont paru nécessaires à une meilleure compréhension de ce travail.

1. Quelques considérations sur les environnements extrêmes

Ces dernières années, en même temps qu'un intérêt grandissant pour les milieux extrêmes, il s'est dégagé un consensus en ce qui concerne la notion même d'environnements extrêmes.

Par conditions extrêmes, on entend généralement un milieu exerçant une pression particulièrement forte sur les organismes qui y vivent; qu'il s'agisse de fortes concentrations en solutés, d'une absence presque totale de nutriments, de températures très élevées ou très basses ou d'autres facteurs.

La logique immédiate d'une telle définition n'exclut pas cependant un point de vue critique. Le terme extrême pris dans cette acception n'est-il pas trop anthropocentrique? Tout se passe comme si tous les environnements hostiles aux êtres vivants évolués et à l'homme en particulier étaient considérés comme extrêmes.

Qu'est ce qui nous permet d'affirmer que le stress d'un organisme vivant en eau douce et obligé de maintenir une pression interne bien supérieure à la pression externe est moins grand que celui d'un organisme halophile qui vit dans un milieu saturé

isocœmotique? Dans un même ordre d'idées, pourquoi ne pas considérer comme hostiles les milieux oxygéniques, au égard à la toxicité de l'oxygène et surtout de ses dérivées?

On pourrait alors tenter de définir les milieux extrêmes comme des milieux dans lesquels prévalent des conditions que l'on ne rencontre que très rarement. Mais alors, pourquoi considérer les psychrophiles comme des "extrémistes" alors que près de 80 % de la biosphère est à une température de 270-280°K? (Kogut 1980).

En fait, comme le souligne Brock (1969), un environnement extrême doit être défini taxonomiquement. Quand on procède ainsi, on s'aperçoit qu'il y a des milieux où certains groupes taxonomiques sont absents; on observe que, sous certaines conditions physicochimiques, la diversité des espèces diminue de manière drastique aboutissant quasiment à la culture pure.

Seuls les environnements à faible diversité taxonomique peuvent être considérés comme extrêmes, parmi eux notamment: les environnements à hautes températures.

Dans ces milieux, il existe un ou plusieurs facteurs qui font que la vie, telle qu'elle a évolué sur terre, est agréessée et que les organismes qui ont malgré tout réussi à se développer dans ces niches là ont dû mettre au point des stratégies particulières.

L'intérêt et, dans certains cas, le financement pour l'étude de ces milieux extrêmes ont été stimulés par la recherche de vie extraterrestre et les questions sur l'origine de la vie. Connaissant les limites actuelles de la vie, on espère pouvoir estimer les conditions ayant permis son émergence. Mais on connaît l'évolution terrestre, plus on sera à même d'extrapoler et de supputer les possibilités de vie extraterrestres - étant bien entendu que des pressions évolutives différentes peuvent amener de grandes variations dans le développement des êtres vivants.

2. Les organismes thermophiles

L'observation d'une vie à haute température est ancienne. Dans son histoire naturelle, Pline l'ancien notait: "Des plantes vertes poussent dans les sources chaudes de Padua (Abano), on trouve des grenouilles dans celles de Pise, des poissons à Vetulonia (Etrurie)" (Pline Secondus Caius, Natural history 1944). Ferdinand Cohn en 1862 écrivait: "Même une simple observation visuelle des différentes couleurs montre que différentes espèces existent à différentes températures de l'eau".

Très tôt, les chercheurs ont insisté sur l'importance à accorder à deux points:

- La nécessité de montrer que les organismes se développent réellement aux températures considérées.
- L'obligation de mesurer la température à l'endroit exact où l'organisme est trouvé.

L'étude d'organismes thermophiles est d'un grand intérêt général. Une telle étude permet d'isoler de nouvelles espèces de bactéries présentant souvent des particularités métaboliques originales, des données phylogénétiques intéressantes ou des applications industrielles utiles. Du point de vue écologique, l'étude des environnements géothermaux fournit des modèles appréciés pour leur "simplicité".

2.1. Classification

La classification des organismes en fonction de leurs températures cardinales de croissance est assez embrouillée. Deux faits contribuent à cette situation insatisfaisante. D'une part, l'échelle des températures à considérer s'élargit à mesure que de nouvelles espèces thermophiles sont décrites et que la température maximale pour la vie est repoussée. D'autre part,

aucune température ne représente une frontière décisive permettant de séparer sans équivoque deux groupes de bactéries.

En 1898 déjà, Schilliger notait l'état insatisfaisant de la nomenclature concernant les organismes thermophiles. Il proposait alors la thermotolérance pour les bactéries se développant à la fois à haute et à basse température et réservait le terme de thermophile pour les bactéries ne se développant qu'à haute température - tout en mettant en doute l'existence de tels organismes!

En près de cent ans, les découvertes d'organismes thermophiles se multiplient, les possibilités d'une classification simple ne se sont pas améliorées. Un certain consensus semble cependant s'être dégagé autour de la définition donnée par Farrell et Campbell (1969) soit:

- Thermophiles stricts ou obligatoires: optimum vers 65-70°C, pas de croissance à moins de 40°C.
- Thermophiles facultatifs: maximum vers 50-60°C, croissance à moins de 30°C possible.
- Thermotolérants: maximum vers 45-50°C, croissance à température ambiante possible.

Le terme de caldocectif introduit par Williams (1975) pour désigner les bactéries se développent à très haute température étant quelque peu contesté - et contestable! - on y préfère généralement celui de thermophile extrême.

Imanacki et Solnzava (1945) préconisant les termes de sténo et eurithermal pour notifier l'étendue de la gamme de température permettant la croissance soit:

- Eurithermal: organisme se développant sur une large gamme de température.
- Sténothermal: organisme se développant sur une étroite gamme de température.

Ces classifications sont valables pour des procaryotes. Il est évident que quand on parle de champignons, de mousses ou de bactéries pathogènes, les limites envisagées ne sont pas les mêmes!

Toute tentative pour une nomenclature plus précise n'offre que peu d'intérêt. D'une part, il y a une série continue de minima et de maxima de croissance, aucune température ne se révèle donc d'importance cruciale. D'autre part, certaines expériences de thermoadaptation semblent montrer qu'il est possible de décaler les limites de température d'une espèce (quoique une partie de ces expériences soient actuellement contestées).

L'utilité de cette terminologie est cependant indéniable; il convient seulement de tenir compte de ses ambiguïtés.

3. Limites de température

Aucune limite de température ne peut être assignée à la vie, dans l'état actuel de nos connaissances. Cependant, il est possible de donner des valeurs limites approximatives pour différents groupes taxonomiques; seuls quelques représentants à l'intérieur de chaque groupe peuvent vivre aux températures indiquées, la plupart se développent à des températures inférieures.

Groupe	Temp.maximale [°C]
Animaux	
Poissons et autres vertébrés aquatiques	38
Insectes	45-50
Ostracodes	49-50
Plantes	
Plantes vasculaires	45
Mousses	50

Groupe	Temp.maximale [°C]
Microorganismes eucaryotes	
Protozoaires	56
Algues	55-60
Champignons	60-62
Microorganismes procaryotes	
Algues bleues (Cyanobactéries)	70-73
Bactéries photosynthétiques	70-73
Bactéries chimiolithotrophes	>90
Bactéries hétérotrophes	>90
Eubactéries	95
Archéobactéries	>110

D'après Brock (1986)

Il ressort de ce tableau que les organismes ayant les structures les plus simples sont les mieux à même de s'adapter aux hautes températures. La question se pose de savoir s'il s'agit là d'une limitation physiologique intrinsèque ou d'un processus évolutif. Il est intéressant de remarquer à ce propos que les plus hautes thermophiles appartiennent à un embranchement qui s'est séparé très tôt dans l'évolution, celui des Archéobactéries.

Il est également possible d'établir un tableau donnant les limites actuellement connues de quelques processus physiologiques.

Processus physiologiques	Temp.maximale [°C]
Respiration soufre	>110
Photosynthèse (<u>Synechoccus</u>)	74
Fixation de l'azote (<u>Mastigocladus</u>)	> 50
Fixation du CO ₂	
- Par Calvin (<u>Bacillus schlegelii</u>)	> 75
- Autre (<u>Pyrodictium</u>)	>110
Oxydation aérobie de l'hydrogène (<u>Hydrogenobacter</u>)	> 85
Vie	???

La limite de 74°C pour la photosynthèse semble bien établie. La plupart des milieux géothermaux étant abondamment éclairé, ce n'est certes pas l'intensité lumineuse qui apparaît comme un obstacle au développement de phototrophes hautement thermophiles. On peut donc supposer que c'est l'appareil photosynthétique lui-même qui ne peut être stable à des températures élevées, à moins qu'il n'y ait là une explication évolutive. La photosynthèse pourrait n'être apparue qu'après que les températures moyennes se soient sensiblement abaissées.

Il en va peut-être de même en ce qui concerne la fixation de l'azote, quoique aucune recherche de fixateurs d'azote hautement thermophiles ne semble avoir été entreprise (à notre connaissance du moins car il faut bien admettre que les résultats négatifs sont rarement publiés!). Stavans et al. (1985) ont rapporté la possibilité, chez Mastigocladus laminosus, de fixer l'azote moléculaire à haute température. Les auteurs ont démontré que ces bactéries étaient capables de réduire l'acétylène en éthylène à plus de 50°C. Mis à part ce résultat, les autres tentatives d'isoler des fixateurs d'azote subbactériens thermophiles se sont révélées négatives. Des espèces phototrophes thermophiles comme Chloroflexus aurantiscus ou Chromatium tepidum sont incapables de fixer l'azote moléculaire (Heda et Madigan 1986, Madigan 1986) alors même qu'elles appartiennent à des groupes où la diazotrophie est très répandue. De fait, la température maximale de croissance de Mastigocladus laminosus (63-64°C) apparaît également comme la température maximale pour la fixation de l'azote (si même la fixation a bien lieu jusqu'aux températures maximales de croissance!). Il est possible que l'expression des gènes "Nif" soit thermosensible comme cela a été démontré chez Klebsiella pneumoniae (Postgate 1982) et qu'il y ait une limite physiologique à la fixation d'azote.

La découverte d'Archéobactéries fixatrices d'azote va peut-être permettre de repousser cette limite. Methanococcus thermolithotrophicus est p.ex. capable de fixer l'azote moléculaire à 60°C (Belay et al. 1984).

Plus étonnante est la découverte de l'absence de cycle de Calvin chez les organismes vivant à plus de 70°C. Si la fixation du CO₂ reste possible en dessous de cette température, c'est par des mécanismes différents du cycle de Calvin. On peut supposer que les enzymes du cycle de Calvin sont trop thermolabiles pour opérer en dessous de 70°C ou que les thermophiles extrêmes sont d'origine ancienne et qu'ils sont apparus à un moment où le cycle de Calvin n'était pas encore la règle. Nous rediscuterons de ce point à propos de la fixation du CO₂ chez les Hydrogenobacter.

En ce qui concerne les limites de la vie, le débat reste ouvert. La seule condition fondamentale étant la présence d'eau à l'état liquide, cela signifie que les limites de température sont les points de congélation et d'ébullition de l'eau, ceux-ci variant en fonction de la pression...

Heinen et Lauwers (1981) ont été les premiers à montrer qu'il était possible de cultiver des bactéries à plus de 100°C. Par ailleurs, ils ont réussi à adapter deux espèces de Bacillus (B. caldolyticus et B. caldotenax) à une croissance à 105°C. Il ne s'agissait là que d'une adaptation et du reste l'expérience n'a pas pu être répétée; mais, en 1982, Stetter réussissait à isoler, d'une sulfatase soufre-marine, des organismes se développant optimalement à 105°C. Il s'agit d'anaérobies strictes appartenant au genre Pyrodictium (Stetter et al. 1983). Baross et al. (1982) isolaient presque simultanément des communautés bactériennes complexes capables de pousser rapidement à 100°C en produisant du méthane, de l'hydrogène et du monoxyde de carbone. Des essais de culture à plus haute température (250°C, 265 atm.) ont été tentés avec ces mêmes communautés et considérées comme concluantes (Baross et Deming 1983). La validité de ces résultats est actuellement mise en doute et aucune confirmation n'a encore été apportée (Trent et al. 1984). Toutefois, le débat est loin d'être clos.

4. Bases moléculaires de la thermophilie

Bien que la recherche des bases moléculaires de la thermophilie ne fasse l'objet d'aucune attention particulière dans ce travail, il nous a néanmoins paru intéressant de dresser un bilan succinct des connaissances dans ce domaine. Nous nous sommes contentés d'en donner un bref aperçu, nécessairement simplifié voire lacunaire, notre unique but étant d'élargir quelque peu le débat en y introduisant des notions qui pourront être utiles lors des discussions ultérieures.

Mis à part leur possibilité de se développer à haute température, les organismes thermophiles ressemblent beaucoup aux organismes mésophiles en ce qui concerne leurs sources de carbone ou d'azote, leurs voies métaboliques, leur existence comme aérobes ou anaérobies, autotrophes ou hétérotrophes...

Cette parenté a autorisé des études comparatives des différents constituants cellulaires bactériens isolés respectivement chez des mésophiles et des thermophiles. En prenant la précaution élémentaire de comparer des composés isolés de "proches parents", minimisant ainsi l'apparition de différences n'ayant rien à voir avec la thermophilie, on peut espérer mettre à jour les bases moléculaires de la vie à haute température.

La température a un effet marqué sur les propriétés physiques et les fonctions de la membrane. La plupart des organismes - et pas seulement les thermophiles - modifient la composition de leurs lipides membranaires en réponse à un changement de température. Ces modifications se traduisent par une variation des pourcentages relatifs des différentes classes d'acides gras. Si la température augmente, on note généralement une augmentation du pourcentage d'acides gras ramifiés ou/et saturés ainsi qu'une augmentation de la longueur des chaînes. En cas de baisse de la température, on a les tendances inverses. D'autres modifications tendent également à stabiliser les membranes aux hautes températures comme l'enrichissement en hydrates de carbone des lipides polaires ou/et la présence d'acides gras alicycliques p.ex. w-cyclohexyl (Langworthy et Pond 1986). Ces régulations

permettent de maintenir la membrane dans un état de fluidité suffisant pour conserver l'intégrité membranaire, permettre les échanges et assurer le bon fonctionnement des protéines membranaires.

Sineneky (1974) a introduit le terme d'homéoviscosité pour caractériser cette conservation de la fluidité membranaire. Il est clair que quand cette viscosité ne peut plus être maintenue - à des températures extrêmes - la croissance n'est plus possible. Bien que la déstabilisation de la membrane n'apparaisse pas comme la cause principale de la diminution du taux de croissance aux températures supraoptimales, elle peut expliquer la brutale cessation de croissance quand la température dépasse la température maximale (Amelunxen et Murdock 1978).

Le comportement des protéines est un des points cruciaux de l'adaptation aux hautes températures. L'hypothèse, séduisante par sa simplicité, d'un facteur unique qui stabiliserait les composants cellulaires a été catégoriquement rejetée à plusieurs reprises (Koffler 1957, Koffler et Gale 1957, Amelunxen et Lins 1968). Une autre explication proposée très tôt par les chercheurs est la possibilité d'une resynthèse rapide des composants cellulaires détruits par la chaleur, mais cette hypothèse n'a pas trouvé de confirmation expérimentale convaincante (Zuber 1979). En fait, un tel mécanisme n'est que rarement nécessaire car les protéines isolées d'organismes thermophiles présentent souvent une résistance accrue à la dénaturation thermique. Remarquons cependant que cette thermostabilité se retrouve également chez des enzymes isolées d'organismes mésophiles. On a pourtant isolé plusieurs enzymes thermolabiles chez des thermophiles (Amelunxen et Murdock 1978). On doit donc dans ce cas supposer que la thermostabilité est acquise par interaction avec diverses substances (substrate, cofacteurs, cations, membranes).

Dans la recherche d'une base moléculaire de la thermostabilité, les approches initiales se sont centrées sur la recherche de propriétés structurelles caractéristiques des protéines isolées d'organismes thermophiles. Ainsi Allen (1953) pensait qu'elles

étaient de petites tailles; Brock (1967) qu'elles devaient leur thermostabilité à une conformation rigide et inflexible. D'autres chercheurs ont comparé les compositions en acides aminés, le nombre de liaisons hydrophobes, le pourcentage des différentes structures secondaires.

Toutes ces investigations se sont révélées peu instructives. En fait, la seule caractéristique des protéines thermophiles semble bien être leur thermostabilité!

Les différences entre protéines de thermophiles et de mésophiles sont donc très variées et subtiles. Elles impliquent probablement l'échange de quelques acides aminés à des positions clé, une répartition légèrement différente des liaisons stabilisatrices etc.

De l'avis de nombreux chercheurs, la thermostabilité est acquise au détriment de l'efficacité catabolique (Ljungdahl et Sherod 1976, Sundaram 1966), d'où des taux d'activité plus faibles que prévus par la loi d'Arrhénius.

Le matériel génétique est également thermostable, soit intrinsèquement, soit par stabilisation avec des protéines comme pour les ribosomes (Brock 1967, Sunderam 1966). L'augmentation du pourcentage guanine + cytosine en fonction de la température établi chez les Bacillus (Stenesh 1976) ne s'est pas vérifié chez les autres groupes.

En résumé: Les organismes thermophiles ont un métabolisme adapté aux hautes températures. Ils ne se contentent pas de survivre ou de "vivoter" péniblement dans des conditions extrêmes, ils y sont optimalement adaptés. Grâce à des changements minimes et non uniformes, leurs constituants sont thermorésistants ou éventuellement stabilisés par des interactions diverses. L'arrêt de croissance à des températures suboptimales ou supraoptimales est le plus souvent dû à l'inactivation d'une ou plusieurs enzymes d'importance vitale, éventuellement à une déstabilisation membranaire.

5. Origine des organismes thermophiles

La question de l'origine de la thermophilie doit reculer aux origines de la vie. Il importe de connaître la température de la terre à l'époque où la vie est apparue - si l'on considère qu'il s'agit d'un événement unique.

Malheureusement, aucun consensus ne s'est encore dégagé en ce qui concerne les températures régnant dans la première moitié du Précambrien (il y a 3-4.10⁹ années). C'est pourquoi on peut esquisser deux schémas évolutifs.

On peut tout d'abord supposer que les organismes thermophiles ont évolué à partir de précurseurs mésophiles (Caetenholz 1979). A l'appui de cette hypothèse, le faible nombre d'espèces rencontré dans les milieux à haute température (seules quelques espèces auraient réussi à s'adapter) et le succès relatif obtenu dans les expériences de thermoadaptation: si on pouvait, en laboratoire, contraindre des organismes à s'adapter à une vie à haute température, cela était certainement aussi possible dans la nature - qui est infiniment plus patiente que les chercheurs!

Les deux arguments prêtent le flanc à la critique. Plutôt que d'être lié à une raison évolutive, le faible nombre d'espèces thermophiles pourrait tout aussi bien être dû à la faible diversité de niches écologiques présentes dans les milieux géothermiques ainsi qu'à notre connaissance encore très partielle de ce type d'environnement. Quant aux expériences de thermoadaptation, elles n'ont été réussies qu'avec des Bacillus, ne semblent pas pouvoir être répétées (Hubert et al. 1986) et en tous les cas ne peuvent être reproduites avec d'autres espèces (Farrel et Rose 1967). Nous reparlerons de l'origine des Bacillus thermophiles dans le chapitre qui leur est consacré. Notons toutefois déjà que ce groupe, ou en tout cas la majorité de celui-ci, paraît avoir une thermophilie secondaire. Autrement dit, il se serait adapté secondairement aux températures extrêmes. On comprendrait mieux alors pourquoi les expériences de

thermoadaptation réalisées avec des représentants de ce groupe (et de ce groupe uniquement) peuvent quelquefois réussir.

L'autre schéma suppose une origine thermophile de la vie. A l'appui de cette hypothèse:

- La forte proportion d'Archéobactéries thermophiles; l'ordre des Sulfolobales est même constitué exclusivement de thermophiles et, comme nous l'avons déjà souligné, c'est dans ce règne que l'on trouve tous les plus hauts thermophiles.
- Le fait que les deux embranchements les plus profonds de l'arbre évolutif des Eubactéries - le groupe des bactéries vartées non sulfureuses et celui des Thermotoga - soient composées de manière prédominante par des thermophiles (Achenbach-Richter et al. 1987).
- La distribution polyphylétique des organismes thermophiles. On peut bien sur supposer qu'il s'agit là d'un caractère adaptatif apparu plusieurs fois au cours de l'évolution, mais il paraît plus simple de postuler que la thermophilie est un caractère primitif qui s'est maintenu chez de nombreuses espèces appartenant à des genres différents, peut-être sous l'effet de pressions écologiques.
- Quelques évidences géologiques qui laissent supposer que la vie est apparue dans un environnement à haute température (Knauth et Epstein 1976, Kaplan 1978, Ernst 1983).
- La corrélation entre l'ancienneté d'une fonction et sa température maximale. L'autotrophie p.ex. a un maximum supérieur à 100°C, mais dans le cas particulier du cycle de Calvin, cycle récent, ce maximum n'est que de 70°C.
- Le schéma très facile à concevoir d'une perte de thermostabilité des organismes thermophiles quand l'environnement se refroidit lentement, peut-être au profit d'une activité catalytique améliorée.

Ce schéma n'exclut cependant pas l'adaptation ultérieure de certains groupes, peut-être des Bacillus, comme mentionné ci-dessus.

Quoiqu'il en soit, en l'absence d'éléments nouveaux, il reste difficile d'établir dans quel sens s'est faite l'évolution et tous les scénarios relèvent quelque peu de la spéculation. Peut-être, en toute justice, faut-il encore citer l'hypothèse d'Arrhénius (1927) qui considère que les thermophiles sont originaires de la planète Vénus, la pression de radiation solaire les transportant en quelques jours jusque sur Terre.

6. Habitats

La nature ubiquiste des thermophiles est attestée par la grande variété de sources d'où ils ont pu être isolés, de la neige fraîche au sable saharien en passant par les eaux salées ou douces, thermales ou non, l'air, les sols.

Nous reviendrons sur le problème de la présence de thermophiles dans des milieux "froids", mais pour ne citer que les environnements présentent des caractéristiques thermiques favorables au développement des organismes thermophiles on peut mentionner:

- Les milieux chauffés par le soleil (sols, eaux peu profondes, roches.)
- La matière organique en décomposition.
- Les environnements dont la haute température résulte de l'activité humaine (boilers, certaines usines...)
- Les environnements géothermiques.

Chacun de ces environnements a des caractéristiques bien différentes en ce qui concerne sa stabilité physicochimique, les températures atteintes, la richesse en matières nutritives, la teneur en oxygène etc. Dans chacun d'eux, on s'attendra donc à trouver des populations différentes.

Nous nous attacherons plus spécialement à l'étude des milieux géothermaux. Ceux-ci, quelles que soient leurs caractéristiques physicochimiques, présentent deux particularités remarquables:

- Une discontinuité géographique marquée - les aires géothermales étant souvent distantes de milliers de kilomètres.
- Une variété réduite de niches écologiques - les conditions très particulières rencontrées dans ces milieux ne les rendant habitables que par certains types d'organismes aux métabolismes bien définis.

III MATERIEL ET METHODES *****

1. Caractérisation du milieu naturel

1.1. Mesure du pH et de la température

La température est mesurée à l'endroit exact du prélèvement à l'aide d'un thermocouple (Digimeter JDC electronic) ou avec un thermomètre à mercure.

Le pH est mesuré avec une électrode de verre (Ebro pH-meter PHX 1400) ou au papier pH.

1.2. Analyses des composants chimiques et des gaz

Ces analyses ont été effectuées à Larderello, dans les laboratoires de l'ENEL, sous la direction du Dr. Bertrami. Les dosages ont été faits par chromatographie. Pour le prélèvement des gaz, nous avons trappé les émanations gazeuses des sources à l'aide d'un entonnoir relié à une bouteille à robinet (Photo 1).

1.3. Analyse des gaz dissous et consommation d'hydrogène

Ces méthodes ont été exposées plus en détail dans Conrad et al. (1985a).

L'analyse de l'hydrogène dissous se fait à partir d'échantillons d'eaux thermales dont l'activité biologique a été stoppée par l'adjonction de HgCl_2 (50 $\mu\text{g/ml}$). Les échantillons sont alors refroidis puis transportés au laboratoire. Le procédé d'analyse a été décrit en détail par Conrad et Seiler (1982); la mesure de l'hydrogène est basée sur la conversion de l'oxyde de mercure en

vapeur de mercure et permet la détection de 2.5 nl d'hydrogène par litre (0.1 nM H₂).

Sur le même échantillon, nous mesurons la teneur en oxygène dissous avec une électrode à oxygène (Syland Scientific Heppenheim).

Pour la mesure de la consommation d'hydrogène, l'eau thermale est rapidement transportée au laboratoire dans des flacons Dewar isolés thermiquement. Des échantillons (40 ml) sont prélevés avec une seringue de 50 ml et incubés 30 minutes à 60°C. Des témoins sont préparés en parallèle en ajoutant soit du NaOH (50 mM) soit du HgCl₂ (100 µg/ml).

La consommation d'hydrogène est suivie en mesurant l'évolution de sa concentration au cours du temps selon la méthode décrite par Seiler (1978) et Seiler et al. (1980). Le test est initié par l'adjonction dans la seringue d'un mélange de gaz, équilibré par agitation avec la phase aqueuse. Ce mélange contient 0.025 % d'hydrogène, dans de l'air pressurisé pour les tests en conditions aérobies ou dans de l'hélium pour les tests en conditions anaérobies. La phase gazeuse est renouvelée - et l'équilibration répétée - à deux reprises puis elle est retirée, la seringue fermée par une valve et l'incubation poursuivie.

1.4. Analyses minéralogiques

Les analyses sont faites sur des échantillons (mélange d'eau et de boue) lyophilisés. Les poudres sont montées par pression (30 bar) sur buvard et analysées par diffraction aux rayons X (Philips automated X-ray diffractometer system AFD-10). Ces analyses ont été réalisées par le Professeur Kübler à Neuchâtel.

1.5. Détermination du carbone organique

Cette mesure a été faite à partir d'échantillons lyophilisés (= 500 mg) avec un appareil 8-ADG (Carmomat Bochum, FRG).

1.6. Mesure de la concentration en ATP

L'ATP a été analysé en collaboration avec le Dr. Maire (EPFL) selon la méthode exposée dans sa thèse (1983).

L'ATP est extrait en milieu acide (H_2SO_4) par agitation thermique et ultrasonication. L'ATP extrait est ensuite stabilisé en milieu tamponné. Après adjonction de luciférase purifiée, nous mesurons par photométrie l'émission lumineuse qui est proportionnelle à la quantité d'ATP. Les pertes sont estimées en dopant certains échantillons avec une quantité connue d'ATP.

2. Milieux de culture

2.1. Milieu minéral de base (MMB)

Le milieu utilisé est celui décrit par Aragno et Schlegel (1981) soit:

$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	4.5	g
KH_2PO_4	1.5	g
NH_4Cl	1.0	g
$MgSO_4 \cdot 2 H_2O$	0.2	g
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0.01	g
Citrate de fer ammoniacal	0.005	g
$NaHCO_3$	5.0	g
Solution trace SL6 10x	1.0	ml
Dans 1000 ml d'eau.		

Ce milieu a un pH légèrement supérieur à 7.

2.2. MMB modifié

Pour approcher les conditions naturelles, nous avons quelquefois apporté des modifications mineures au milieu minéral de base. Ces modifications ont porté soit sur le pH, soit sur la salinité. Le pH est ajusté aux valeurs choisies avec du NaOH ou du HCl.

concentrée. La salinité est augmentée par adjonction de NaCl jusqu'à une concentration finale de 3 % (salinité de l'eau de mer).

2.3. Milieu pour Bacillus thaciæ

Ce milieu est une variante du MMB. Il contient en plus de l'acide tartrique (50 mM); le pH est ajusté à 4.5 avec du NaOH 1 M et la quantité de phosphate n'est que le cinquième de celle du MMB. L'adjonction de l'acide tartrique permet de tamponner le milieu; ce composé n'est pas métabolisé et n'a aucun effet inhibiteur, il n'a donc aucune influence sur la croissance.

2.4. Milieus complexes

Les milieux complexes suivants ont été utilisés:

- Extrait de levure 0.5 % (Difco, Detroit, MI, USA)
- Nutrient broth 0.8 % (Difco, Detroit, MI, USA)
- Standard I broth 2.5 % (Merck, Darmstadt, FRG)

2.5. Milieus solides

La gélification des milieux se fait généralement avec 1.5 % d'agar purifié (Oxoid n°1). Dans certaines cas, nous avons également utilisé de la gelrite (Kelvo Div. of Merck & Co Inc., San Diego, Calif.); les différents essais réalisés avec cet agent gélifiant sont consignés dans le chapitre VA sous le point 8.

3. Méthodes d'enrichissement et de purification

3.1. Prélèvement

Les échantillons, généralement un mélange de boue et d'eau, sont récoltés dans des flacons plastique de 50 ml ou dans des tubes en

polypropylène de 10 ml, stérilisés.

Quand l'inoculation ne peut pas être faite le jour même du prélèvement, les échantillons sont stockés, et éventuellement transportés, à basse température.

3.2. Enrichissement

En conditions stériles, - 1 g ou 1 ml d'échantillon sert d'inoculum. Le milieu est choisi en fonction des conditions (pH, température, salinité) du site de prélèvement et des particularités métaboliques des bactéries que nous désirons mettre en évidence. Généralement, nous utilisons le MMB. Les cultures se font dans des flacons en verre, avec capuchon plastique, de 100 ou 50 ml contenant respectivement 20 et 10 ml de milieu, éventuellement en tube en verre contenant 4 ml de milieu.

3.3. Purification

Après 3 à 5 jours d'incubation, une aliquote (≈ 0.5 ml) de la culture d'enrichissement sert d'inoculum pour une nouvelle culture. Cette procédure est répétée 5 à 10 fois. Si nous désirons plus spécialement isoler des bactéries sporulantes, nous pasteurisons les échantillons 10 minutes à 90°C après la première culture d'enrichissement.

La purification se fait par inoculation sur milieu solide et repiquage des colonies isolées. Quand la croissance sur milieu solide n'est pas possible, nous procédons par dilution. Des dilutions (10^{-2} - 10^{-12}) d'une culture en croissance exponentielle sont mises en culture; la pureté de la dilution la plus élevée permettant la croissance est contrôlée. En cas de doute, la procédure est répétée. La pureté est testée visuellement au microscope à contraste de phase, par l'aspect

homogène des colonies (quand il y en a) et, ultérieurement, par l'observation de la courbe de dénaturation de l'ADN.

3.4. Conditions d'incubation

Les flacons ou les boîtes sont placés dans un récipient étanche d'où l'on retire l'air que l'on remplace par le mélange de gaz suivant: hydrogène: 0.45 bar / oxygène: 0.05 bar / gaz carbonique: 0.1 bar (mélange standard). Une dépression est maintenue pour éviter toute surpression consécutive à la dilation des gaz à haute température. L'incubation se fait dans des étuves réglées à la température choisie. Au vu des valeurs de température mesurées sur le terrain, nous avons choisi de travailler à 55°C, 65°C et 80°C, le choix de la température se faisant en fonction des valeurs mesurées aux sites de prélèvement.

Les cultures ne sont pas agitées.

3.5. Numération

Les numérations sont faites selon la technique du Most Probable Number (MPN). De façon à limiter le matériel, nous avons inoculé seulement trois tubes par dilution; chaque tube contient 3 ml de MMB. L'inoculation se fait avec 1 g (1 ml) d'échantillon.

4. Caractérisation

4.1. Cultures "batch"

Les cultures batch sont réalisées en flacons pyrex à vis de 100 ou 50 ml contenant respectivement 20 et 10 ml de milieu. Pour l'obtention de grandes quantités de cellules, les cultures sont faites en flacons de Fernbach contenant 500 ml de milieu. Les cultures en éprouvettes sont faites dans des tubes de 18 mm de diamètre contenant 4 ml de milieu.

4.2. Croissance en fermenteur

La croissance en fermenteur se fait avec un appareil "Multigène" (New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ, USA). La cuve, d'une contenance de 2 l, est remplie avec 1.2 l de milieu. L'agitation est ajustée en fonction du type de croissance et des organismes étudiés. Le pH est mesuré manuellement et corrigé par adjonction de NH_3 concentré.

4.3. Mesure de la densité optique

La densité optique des cultures est mesurée par turbidimétrie à 436 nm dans des cuvettes de 1 cm avec un spectrophotomètre Zeiss PM4. Elle est ajustée par dilution de manière à obtenir une extinction E_{436} comprise entre 0.1 et 0.3.

Cette mesure sera systématiquement abrégée par la notation: "DO", sans autre spécification.

4.4. Concentration en protéines

Pour déterminer la concentration en protéines, nous suivons la méthode du biuret telle qu'elle est décrite par Schmidt et al. (1963). L'albumine de sérum de boeuf sert de protéine standard.

4.5. Températures cardinales

Une première estimation des températures cardinales de croissance est faite en incubant des cultures liquides à différentes températures. De façon à affiner les résultats obtenus, nous avons également travaillé avec un incubateur à gradient de température (Scientific Industries), mis à notre disposition par la station fédérale de Liebefeld. Cet appareil permet d'obtenir un gradient thermique théorique de 0 à 95°C, réparti sur 30 positions. Chaque position est occupée par un tube à septum d'une contenance de 16 ml. La calibration du gradient de température se

fait avec ces tubes remplis d'eau. Une préculture de 24 heures est utilisée pour inoculer 120 ml de MMB qui sont répartis dans les 30 tubes à l'aide d'une seringue. Chaque tube est ensuite gazé avec le mélange standard pendant 1 minute à un débit de 400 ml/min. Les tubes sont alors placés dans l'appareil à gradient et agités au minimum. L'évolution de la croissance est suivie par turbidimétrie à 436 nm en plaçant directement les tubes dans un spectrophotomètre Bausch and Lomb. L'oxygène est rapidement consommé et constitue un facteur limitant de la croissance, nous réinjectons donc aux cultures dès que la densité optique atteint 0.1.

4.6. pH optimal

Pour déterminer le domaine de pH permettant la croissance, ainsi que les pH optimaux, nous incubons les souches dans des milieux dont les pH ont été ajustés à différentes valeurs avec du HCl 1/2 concentré ou du NaOH 4 M. Le pH est mesuré avant l'incubation mais après autoclavage. Comme certaines des valeurs sont en dehors de la zone tampon du milieu utilisé, nous remeasurons le pH à plusieurs reprises au cours de la croissance, en même temps que la DO. Quand cela est possible, nous calculons, à partir des valeurs de DO mesurées, le taux de croissance correspondant à chaque pH (pH moyen établi sur les différentes valeurs mesurées).

5. Caractéristiques nutritionnelles

5.1. Sources de carbone

L'utilisation de composés organiques comme seule source de carbone et d'énergie est testée en milieu liquide avec l'ammonium comme source d'azote. Le MMB est complété soit avec 2 g/l d'hydrates de carbone, soit avec 0.5 g/l de formiate, soit avec 1 g/l des autres composés. Un témoin sans source de carbone sert de contrôle. L'incubation se fait dans un récipient étanche limitant

ainsi les problèmes d'évaporation et permettant des incubations prolongées (jusqu'à trois semaines).

5.2. Sources d'azote

L'utilisation de composés comme seule source d'azote est testée en conditions autotrophes. Le MMB préparé sans NH_4Cl est complété avec 0.2 g/l de NaNO_2 ou avec 1 g/l des autres composés azotés. L'urée devant servir de source d'azote est stérilisée par filtration afin d'éviter sa dégradation à la chaleur.

5.3. Fixation d'azote moléculaire

5.3.1. Test présomptif

Les souches sont cultivées dans un milieu sans azote combiné (MMB sans NH_4Cl) mais en présence d'azote dans la phase gazeuse (H_2 : 0.25 bar / N_2 : 0.1 bar / CO_2 : 0.1 bar / O_2 : 0.05 bar). Ce test de croissance en condition de fixation d'azote fournit des indices quant à l'éventuelle présence d'une nitrogénase.

Des témoins sont cultivés d'une part dans une atmosphère dépourvue d'azote, d'autre part en présence de NH_4Cl .

5.3.2. Test de réduction à l'acétylène

L'activité de la nitrogénase est testée en mesurant la réduction de l'acétylène en éthylène selon la méthode de Postgate (1972). Aucun autre système biologique n'effectuant cette réaction, celle-ci est tout à fait spécifique de la nitrogénase (Postgate 1982). De plus, la détection aisée de l'éthylène par chromatographie en phase gazeuse en fait une méthode de choix.

Le test est réalisé en conditions autotrophes. Les précultures sont faites dans le MMB contenant seulement 1/5 de la quantité normale de NH_4Cl de façon à épuiser les réserves d'azote

endogènes. 5 ml de préculture sont utilisées pour inoculer du MMB sans NH_4Cl mais additionné de 100 $\mu\text{g/l}$ d'extrait de levure destiné à permettre l'initiation de la croissance. Les cultures sont faites dans des flacons à septum contenant 50 ml de milieu; l'incubation se fait en conditions microaérophiles: H_2 : 0.1 bar / N_2 : 0.05 bar / CO_2 : 0.05 bar / O_2 : 0.05 bar.

Après une première période d'incubation de 24-48 h, le mélange de gaz est renouvelé et on y ajoute 1 ml d'acétylène avant de reprendre l'incubation pour 24 h. Après ce laps de temps, nous prélevons 1 ml du mélange de gaz que nous analysons à l'aide d'un chromatographe "Variant Aerograph Series 1700" équipé d'une colonne Porasil C en verre avec l'azote comme gaz vecteur. L'activité de la nitrogénase se traduit par la présence d'éthylène. Les positions respectives des pics d'acétylène et d'éthylène sont déterminées au préalable par l'injection de ces substances purifiées.

La souche Neu 2227, proche de Pseudomonas pseudoflava est utilisée comme témoin positif; la même souche cultivée en présence de 1g/l de NH_4Cl (répresseur de la fixation d'azote) constitue un témoin négatif.

6. Utilisation de composés réduits du soufre

6.1. Tests de croissance

Les cultures sont faites en milieu liquide; le MMB est complété soit avec du soufre, soit avec du thiosulfate. Le soufre élémentaire est stérilisé à sec et ajouté sous forme de poudre au milieu, jusqu'à une concentration d'environ 0.5 % (p/v). Le thiosulfate est stérilisé séparément sous forme d'une solution à 25 % (p/v) et ajouté au MMB de façon à obtenir une concentration finale de 0.5 % (p/v). L'incubation se fait en conditions microaérophiles, O_2 : 0.05 bar / CO_2 : 0.1 bar / N_2 : 0.4 bar. La croissance est estimée en suivant l'évolution de la DO, du pH et par observation des cultures au microscope.

6.2. Dosage du thiosulfate

Le thiosulfate est déterminé par titration avec une solution iodoiodurée: 1 g I_2 / 2 g KI / 1 ml H_2O , complété après dissolution à 100 ml avec H_2O . Le dosage se fait avec 5 ml de culture non diluée.

6.3. Dosage du sulfate

Le sulfate est analysé par gravimétrie d'après la méthode de Friedrich et Mitrenga (1981). A 5 ml de surnageant, on ajoute 0.1 ml de HCl = 5 N (1/2 concentré) et 0.4 ml de $BaCl_2$ 0.5 M. Après 2 heures, le mélange est filtré sur filtre milipore (HAWP 0.45 μm diamètre: 25 mm) préalablement taré. Les filtres sont séchés à poids constant sous vide à 40°C. Le précipité de $BaSO_4$ est ainsi quantifié et donc la quantité de sulfate présente dans la culture.

Ce test peut également être réalisé de manière qualitative; l'apparition d'un précipité lors de l'adjonction de $BaCl_2$ à une culture acidifiée traduit la présence de sulfate.

6.4. Croissance mixolithotrophe

Des essais de croissance ont été faits en utilisant de façon conjointe deux sources d'énergie et d'électrons, soit le thiosulfate et l'hydrogène. Pour cela, nous ajoutons au MMB 0.5 % de thiosulfate et incubons les cultures sous le mélange de gaz standard.

7. Tests biochimiques

Les tests biochimiques sont, sauf indications contraires, réalisés en cultures liquides.

7.1. Hydrolyse de l'amidon

Le MMB est complété avec 2g/l d'amidon soluble. Après croissance, l'adjonction d'une solution iodolodurée permet de visualiser la consommation d'amidon.

7.2. Tolérance à la glycine et au NaCl

La croissance en présence de NaCl (10, 30, 50 g/l) ou de glycine (10 g/l) est contrôlée qualitativement. Le MMB sans adjonction sert de témoin.

7.3. Utilisation des nitrates

Pour tester la réduction des nitrates et la respiration nitrée anaérobie, le MMB est complété avec 1 g/l de KNO_3 . Le nitrite est détecté avec le réactif de Griess (Holding et Collee 1971) et une cloche de Durham inversée sert à visualiser le dégagement d'azote moléculaire.

7.4. Tests de la catalase et de l'oxydase

L'activité de l'oxydase est testée en ajoutant à une aliquote de culture 1 goutte de réactif API OX (API 7046: 1 g tétraméthyl-p-phénylène diamine dans 1000 ml d'alcool isoamylique).

L'activité de la catalase est détectée en ajoutant 5 gouttes de H_2O_2 (3 %) à une culture autotrophe réalisée sur milieu solide.

7.5. Sensibilité à la pénicilline

La sensibilité à la pénicilline est testée en conditions autotrophes avec des concentrations de pénicilline G de 0.039 à 20 U/ml (Wallhäuser et Schmidt 1967). A cause de la dégradation de cet antibiotique à la chaleur, la croissance finit par être possible quelle qu'ait été sa concentration initiale; nous mesurons donc la concentration n'induisant pas de retard à la croissance (Schenk et Aragno 1979).

7.6. Poly β hydroxybutyrate (PHB)

La mise en évidence du PHB se fait par observation au microscope à contraste de phase de cultures carencées en azote, MMB avec seulement 1/5 de la concentration normale en NH_4Cl . Une confirmation est faite par coloration des inclusions au noir de Soudan (Norris et Swain 1971).

8. Tests enzymatiques

8.1. Préparation de fractions subcellulaires

Les cellules sont récoltées par centrifugation, 10 minutes à 4.500 g, lavées deux fois avec du tampon phosphate, 50 mM, pH 7, puis cassées par passage dans un fractionnateur de cellules Sorvall RM à 1700 bar ("French Press").

Les cellules entières et les débris sont éliminées par centrifugation à 10.000 g pendant 10'.

L'extrait cellulaire obtenu est alors centrifugé à 140.000 g pendant 90'. Le surnageant - fraction soluble - est séparé du culot - fraction particulaire - qui est resuspendu dans le tampon phosphate (même volume que celui de la fraction soluble).

8.2. Activité de l'hydrogénase

L'activité de l'hydrogénase est mesurée en suivant, par spectrophotométrie, la réduction du bleu de méthylène (570 nm) ou du NAD(P)⁺ (340 nm), en présence d'H₂. Nous suivons la méthode décrite par Aragno et Schlegel (1981) mais en travaillant, pour les essais de routine, avec des cellules entières.

L'expérience se fait à 50°C, température constituant un bon compromis entre la température optimale de l'hydrogénase et les contingences pratiques. Pour chaque mesure, un témoin est réalisé en remplaçant le gazage à l'hydrogène par un gazage à l'azote afin de tenir compte des réactions parasites.

8.2.1. Activité en fonction de la température

L'activité de l'hydrogénase est mesurée à différentes températures, arbitrairement choisies, sur des cellules cultivées à température optimale. Le mélange réactionnel n'est pas modifié.

8.2.2. Localisation

L'activité de l'hydrogénase est mesurée à la fois dans les fractions solubles et particulaires. L'activité de la malate déshydrogénase (Aragno et Schlegel 1981) est suivie en parallèle pour contrôler l'efficacité de la séparation des fractions.

8.3. Activité de la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase

L'activité de la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase (RUBP carboxylase) est mesurée à 50°C en suivant l'incorporation de NaH¹⁴CO₃. RUBP dépendante sur des cellules entières perméabilisées au toluène d'après la méthode de Anderseen (1979) modifiée par Faenschel (1987).

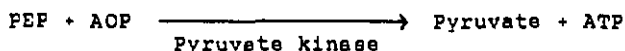
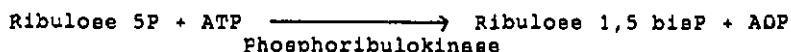
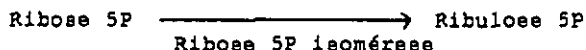
Des cellules d'Aquaspirillum autotrophicum (ATCC 29984) sont utilisées comme témoin.

8.4. Activité de la phosphoribulokinase

La phosphoribulokinase (PRK) a été testée en se basant sur les méthodes de Siebert et al. (1981) et Kagawa (1982). Des modifications substantielles ayant été apportées à ces méthodes, nous décrirons en détail la procédure suivie.

Principe:

La formation de ribulose 1,5 bisphosphate à partir de ribulose 5P, produit de l'activité de la PRK, est couplée à la consommation de NaOH, mesurable par spectrophotométrie, selon les équations suivantes:



Solutions:

- Tris HCl		1	M	pH 8.6	
- Tampon PRK	Mepes KOH	20	mM	pH 7.0	2.38 g
	MgCl ₂	10	mM		1.02 g
	EDTA	1	mM		1 ml EDTA 0.5 mM
					500 ml H ₂ O

Au moment de l'emploi, prendre le volume nécessaire, y faire barboter un peu d'azote, ajouter du dithiothreitol (DTT) jusqu'à une concentration finale de 1 mM.

- MgCl_2 0.2 M
- NADH 0.01 M
- ATP 0.05 M
- Ribose 5P - 0.05 M

Le ribose est vendu sous forme de sel de baryum, il est nécessaire de le transformer en sel de sodium. Pour cela, dissoudre 0.07 g de sel de baryum dans 3 ml d'eau, acidifier légèrement pour bien dissoudre (H_2SO_4), ajouter 150 μl de Na_2SO_4 1 M, centrifuger. Contrôler que le surnageant reste limpide si on y ajoute une goutte de Na_2SO_4 . Récupérer le surnageant.

- Phosphoenolpyruvate 5 mM
- Pyruvate kinase - 350 UI/ml
- Lactate déshydrogénase - 10.000 UI/ml
- Phosphoriboisomérase - 400 UI/ml

Traitement des cellules:

Les cellules, environ 1 g, sont récoltées par centrifugation et lavées deux fois dans le tampon PRK. Le culot est resuspendu dans 5 ml de tampon. La DO avoisine alors 100. Les cellules sont cassées par trois passages successifs à la "French Press" (1700 bar) à une température de 0-4°C. On ajoute alors 10 μl de ONase (1 mg/ml). Le jus cellulaire est centrifugé tout d'abord 20 minutes à 40.000 g puis une heure à 140.000 g. Le surnageant contient la PRK. A ce stade, l'échantillon peut être conservé quelques heures au frigo.

Mélange réactionnel:

Entre parenthèses, indication des concentrations finales.

100 μl Tris HCl (100 mM); 50 μl MgCl_2 (10 mM); 60 μl NaOH (0.6 mM); 50 μl pyruvate kinase (= 170 UI); 50 μg ribose isomérase (= 20 UI); 35 μl lactate déshydrogénase (35 UI); 100 μl ATP (5 mM); 60 μl phosphoenolpyruvate (5 mM); (395 - v) ml H_2O ; v ml échantillon (= 50 μl).

Suivre la réaction à 365 nm. Après stabilisation de la pente, ajouter 100 µl de ribose 5P (5 mM).

Volume total: V = 1 ml

Expression des résultats:

La pente dE/dt à prendre en considération est la différence entre les pentes avant et après addition de ribose 5P.

V: volume total

v: volume d'échantillon

d: largeur de la cuvette

E: coefficient d'extinction du NADH à 365 nm (3.3)

Cp: concentration en protéines

A: activité de la phosphoribulokinase, en µmol NADH oxydé par minute et mg de protéines (U/mg).

$$A = \frac{V}{E d v C_p} \frac{dE}{dt}$$

8.5. Activité de l'α-cétoglutarate déshydrogénase

L'α-cétoglutarate déshydrogénase a été testée sur des extraits cellulaires à 50°C. Nous avons suivi la méthode de Reed et Murkherjee (1969).

9. Ultrastructure

Pour les observations au microscope électronique, nous travaillons avec un microscope Philips EM 201.

Nous utilisons des grilles de 200 ou 400 mesh (Balzers Union), recouvertes de plastique et d'un film de carbone.

9.1. Coloration négative

Nous avons suivi la méthode de Lickfield (1976).

Un petit bouchon en plastique est rempli avec quelques ml du matériel à observer (suspension de bactéries, parois). Dans deux autres bouchons, nous mettons respectivement de l'eau stérile et filtrée et de l'acétate d'uranyle 2 %. Nous déposons une grille successivement sur chacune des trois solutions, chaque passage durant approximativement 30 secondes. Après séchage, la grille est prête à être observée.

9.2. Coupes fines

Les coupes sont confectionnées selon la méthode de Lickfield (1976). Les cellules sont préfixées dans une solution de glutaraldéhyde, puis fixées à l'osmium. Après inclusion dans de l'agar, le matériel est fixé avec de l'acétate d'uranyle. L'échantillon est alors déshydraté puis inclus dans une résine.

Les coupes fines (6 nm) sont réalisées avec avec un microtome Sorvall Porter Blum MT 2B. Les coupes sont récoltées sur une grille et contrastées au citrate de plomb.

9.3. Préparation des parois

Les parois sont préparées selon la méthode de Sleytr et Glauert (1976). Les cellules sont cassées par passage à la "French Press" à 136 bar, traitées avec DNase et RNase, centrifugées et lavées puis traitées avec du Triton X 100 pour éliminer les restes de membranes plasmiques. Après lavage, les parois sont observées en coloration négative.

10. Caractérisation du génome

Les détails des procédures utilisées pour l'isolement de l'ADN, la détermination du pourcentage guanine + cytosine et les expériences d'hybridation ont été donnés par Jenni et al. (1987).

Les principes en sont les suivants:

- L'ADN est isolé sur une colonne d'hydroxyapatite selon une modification du principe de Cashion et al. (1977). L'ADN concentré, en solution dans du SSC, est stocké au congélateur.
- Le pourcentage G + C est calculé à partir de la température de dénaturation dans du SSC 0.1 x avec de l'ADN de E. coli B (DSM 2840) comme référence. Le profil de dénaturation est suivi à 260 nm avec un spectrophotomètre Gilford 2600 thermoprogrammable suivant le principe de Marmur et Doty (1962). Les calculs sont faits d'après l'équation de Owen et Hill (1979).
- Les expériences d'hybridations sont faites en suivant la méthode de Norgard et Bartell (1978). Les cuvettes contiennent 300 µl d'une solution d'ADN (75 µg dans 25 % formamide et SSC 6 x). La température de réassociation est de 70°C. La courbe de rénaturation est suivie par spectrophotométrie à 270 nm. Les calculs sont faits d'après De Ley et al. (1970).

11. Analyse des données

Les données des tests phéno et génotypiques sont traitées par analyse numérique. Les distances sont calculées comme $1 - s_j$ (distance de Soergel) où s_j est le coefficient de Jaccard (Jaccard 1908, Sneath 1957). Les dendrogrammes sont dessinés à partir de la matrice des distances ou de la matrice des homologues ADN-ADN en utilisant un chaînage simple.

12. Conservation des souches

Les cultures liquides sont stockées à 4°C et repiquées tous les deux à trois mois. Bien que dans ces conditions les cultures restent viables près d'une année, un repiquage plus fréquent est préférable si l'on veut avoir des cellules repoussent rapidement et sans problème. Malgré le caractère thermophile des souches utilisées, il est tout à fait déconseillé de les conserver à température ambiante, bien que toute croissance soit stoppée en dessous de 37°C. En effet, dans ces conditions, la mortalité est beaucoup plus élevée qu'à 4°C et le risque de contamination plus grand.

A plus long terme, les cultures sont lyophilisées.

13. Liste des abréviations

APS	Adénosine phosphosulfate
Conc.	Concentré
Cyt	Cytochrome
Corq	Carbone organique
DO	Densité Optique mesurée à 436 nm
DDT	Dithiothreitol
G + C	Guanine + cytosine
MMB	Milieu Minéral de Base
MPN	Most Probable Number
PEP	Phosphoénolpyruvate
P.ex.	Par exemple
PHB	Poly β hydroxybutyrate
PRK	Phosphoribulokinase
RUBP carboxylase	Ribulose 1,5, bisphosphate carboxylase
SSC	Standard Saline Citate Buffer; 0.15 M NaCl, 0.015 M citate trisodium, pH 7.0
TCA	Cycle tricarboxylique
TDS	Total Dissolved Solutes
VPL	Voir plus loin

IV. LES MILIEUX GEOTHERMAUX ET VOLCANIQUES

La masse de chaleur qui conditionne la température de la superficie et de l'intérieur de la terre a deux origines indépendantes:

- L'énergie solaire qui a une puissance d'environ $1.5-1.8.10^{23}$ KW pour la superficie totale de la terre et qui est responsable des variations de température de surface.
- L'énergie interne, dérivée du flux de chaleur profond, d'une puissance d'environ 3.10^{10} KW.

Les variations journalières de température des sols cessent de s'exercer à environ 0.5 m de profondeur, celles saisonnières à environ 10 m.

A une distance de 10-30 m de la surface, la température est pratiquement égale à la température annuelle de l'endroit. A partir de cette zone là, elle croît régulièrement selon un gradient valant en moyenne $3^{\circ}\text{C} / 100 \text{ m}$.

Ce flux de chaleur serait dû en partie à un résidu de la chaleur initiale (provenant de la décomposition des éléments radioactifs à vie assez brève) ainsi qu'à la décomposition des éléments radioactifs encore présents. Les anomalies du gradient se rencontrent d'habitude aux frontières de plaques lithosphériques, là où des masses magmatiques fluides remontent vers la surface. La circulation convective de fluides chauds dans des régions fissurées par un tectonisme actif engendre des sources chaudes ou des champs fumerolliens. Le fluide principal, l'eau liquide ou gazeuse, est presque toujours d'origine superficielle. L'eau magmatique, si il y en a, est toujours mélangée à une importante proportion d'eau de surface.

L'origine essentiellement météorique des eaux géothermales a été prouvée sur la base de la composition isotopique de l'eau. Le rapport D/H de l'eau géothermale est en effet identique à celui de l'eau intersticielle locale froide. Cela prouve leur origine commune à partir de précipitations infiltrées (Panichi et Gonfiantini 1978). L'oxygène est généralement enrichi en ^{18}O - par rapport à l'eau météorique - à cause de l'échange isotopique entre l'oxygène de l'eau et celui des roches du réservoir où prend place une circulation profonde (Panichi et al. 1974, Panichi et Gonfiantini 1978). Le rapport D/H n'est pas influencé par un échange isotopique car la teneur en hydrogène des roches du réservoir est faible.

Les sources chaudes sont répandues un peu partout, mais surtout dans les zones volcaniques, même là où les volcans sont depuis longtemps éteints. Elles marquent le dernier stade de la perte de chaleur des masses en fusion. L'eau de pluie pénétrant à l'intérieur des champs géothermiques est chauffée par contact. Dans de rares cas, comme p.ex. à Larderello en Toscane ou à The Geysers en Californie, la température est suffisante pour permettre la formation de vapeur souterraine surchauffée, laquelle est mélangée à des quantités plus ou moins importantes de CO_2 et à des traces d'autres gaz. Au cours de sa remontée le long des fentes, la vapeur se refroidit par détente adiabatique et perte de chaleur par conduction dans les roches avoisinantes. Si cette ascension se prolonge, la vapeur peut se condenser en eau chaude qui jaillit sous forme de source thermique. Plus fréquemment encore, la vapeur rencontre une nappe d'eau souterraine qu'elle transforme en eau thermique.

Certaines sources thermales sont riches en acide carbonique, d'autres en hydrogène sulfuré, presque toutes ont une teneur en sels dissous importante. Les matières dissoutes dans les eaux thermales proviennent le plus souvent du lessivage des roches encaissant les chenaux souterrains mais elles peuvent aussi, partiellement du moins, être d'origine profonde.

Les eaux thermales sont généralement riches en chlorure et en sodium, des réactions secondaires peuvent modifier cette composition initiale.

Selon White (1957) on aurait quatre types chimiques principaux:

- chlorure - sodium
- chlorure - sulfate, acide
- sodium - bicarbonate
- calcium - bicarbonate

A Larderello, la vapeur surchauffée d'origine profonde est associée à d'autres gaz, principalement CO_2 et H_2S et entraîne de l'acide borique. Elle ne contient pas cependant de gaz tels que des chlorures de sodium ou/et de calcium car à la température du fluide, environ 250°C , ces sels ne sont pratiquement pas volatils.

Des sources de vapeur et d'hydrogène sulfuré aux températures allant de 90° à 300°C abondent dans toutes les régions volcaniques du monde et sont partout appelées fumerolles. L'oxydation de l'hydrogène sulfuré produit, outre de l'acide sulfurique, du soufre élémentaire qui se dépose autour des bouches thermales en beaux cristaux monocliniques. Quelquefois, ce dépôt est assez important pour justifier une exploitation industrielle et les sources chaudes sont alors appelées solfatares. Les vapeurs et les solutions chargées d'acide sulfurique attaquent les roches encaissantes et les décomposent souvent entièrement. Le lessivage des bases donne des sulfates solubles tandis que la silice des silicates se dépose sous forme d'opale extrêmement poreuse.

Une étude de Waring (1965) montre que les eaux thermales sont largement distribuées sur la surface terrestre; cependant, les sources sont souvent concentrées sur des aires assez restreintes. Les plus importantes concentrations de sources chaudes et de fumerolles se trouvent dans les régions volcaniques de l'URSS (Kamtschatka, Arménie), d'Islande, de Nouvelle-Zélande et du Japon. Pour des raisons logistiques, aucune de ces zones ne

pouvait être choisie pour une étude à réaliser en Suisse et pour laquelle le budget ne permettait pas de céder à la tentation des longs voyages. De fait, les manifestations géothermales "célebres" les moins éloignées de la Suisse étaient, à notre connaissance, celles de la région de Naples: les Champs Phlégréens. C'est donc là que nous avons effectué notre première campagne d'échantillonnage. Informés par la suite de l'existence d'une zone thermique en Toscane, nous y avons concentré nos recherches. La majorité des souches étudiées vient donc de cette région. Accessoirement, il nous a été possible de faire d'autres prélèvements - ou d'en recevoir - de diverses régions d'Italie et d'Islande (voir Fig.1 et 8).

1. La région géothermale de Larderello

1.1. Historique

La région géothermale de Larderello se situe en Toscane à ~ 70 km au S-O de Florence et à ~ 70 km au SS-E de Pise (Fig.1 et 2).

Les manifestations de cette région sont connues depuis fort longtemps puisqu'on en trouve mention dans le *Tabula Itineraria Peutingeriana* (3^{ème} siècle après J-C). Selon K.Miller (*Itineraria Romana*), l'acide borique déposé par les vapeurs et les eaux chaudes était probablement utilisé par les Etrusques de l'ancienne Veletri (Volterra) pour la fabrication des vernis rouges et noirs employés pour la décoration des vases.

Durant la Renaissance, les manifestations thermales sont exploitées pour leur richesse en soufre et en alun. En 1777, Hoesfer - directeur des pharmacies du grand duc de Toscane - découvre la présence d'acide borique dans les eaux du lagon. Dès 1799, Mascagni propose une méthode d'extraction industrielle utilisant la chaleur de l'eau et de la vapeur pour faire évaporer la solution borique. La réalisation de ce projet est tentée entre 1815 et 1818 mais avec peu de succès et on recourt à l'énergie de

combustion du bois jusqu'en 1824, année où F. Larderel améliora le processus d'utilisation de l'énergie géothermique dans le but de récupérer l'acide borique. En 1830, Larderel tenta le premier essai de transformation de l'énergie géothermique en énergie mécanique mais sans succès.

Il faudra attendre 1904 pour que Ginori Conti réussisse à allumer 5 ampoules à l'aide d'un moteur alternatif alimenté en vapeur naturelle (séparée de l'eau) par un soffione. N.B. 1^{ère} centrale électrique alimentée par de la vapeur, Edison, 1882.

En 1905, Larderallo est éclairé par "géothermie".

En 1912, une première centrale est construite fournissant 250 KW. L'eau des soffioni sert à chauffer un circuit secondaire d'eau pure. Ce n'est qu'après la guerre qu'on utilise directement la vapeur naturelle pour produire l'électricité.

En 1970, les différentes centrales installées ont une puissance de près de 400.000 KW. fournissant environ 2,7 milliards de KWH par année. En même temps, l'importante production de composés chimiques: H_2BO_3 , CO_2 , NH_3 , He (découvert pour la première fois sur terre à Larderallo) diminue jusqu'à disparaître complètement.

1.2. Géologie

Larderallo doit ce succès exceptionnel à des conditions géologiques particulières. La région boracifère correspond à une vaste anomalie de la gravité attribuée à la présence d'une masse magmatique à 6-8 km de profondeur. Celle-ci n'est apparemment pas encore tout à fait refroidie et réchauffe l'eau en la transformant en vapeur sèche légèrement surchauffée. Cette vapeur qui contient environ 1 % d'autres gaz (CO_2 , H_2S , NH_3 , H_2 , N_2 , CH_4) remonte vers la surface à travers un réseau serré de fissures et donne naissance aux soffioni (soufflards). Les hautes pressions (jusqu'à 35 atmosphères) et températures (jusqu'à 260°C) de la vapeur surchauffée sont conditionnées par une disposition particulièrement favorable des couches géologiques.

La série de couverture est formée par du flysch, alternance de sédiments avec un composant argileux et imperméable très important. Ce flysch couvre une épaisse formation de calcaires vacuolaires et des dolomies triasiques qui surmontent à leur tour des schistes triasiques et permocarbonifères. Ceux-ci sont traversés par des fissures qui se prolongent en profondeur. En montant le long de ces fissures, la vapeur forme dans les cavités des calcaires et des dolomies de véritables chaudières à vapeur, isolées vers le haut par des argiles sus-jacentes. L'absorption d'eau météorique alimentant la circulation profonde se fait dans les parties périphériques de la région boracifère où affleurent des terrains perméables. Ainsi, toutes les conditions sont-elles remplies pour une circulation par convection d'eau sous pression à haute température et pour la formation de vapeur dans les zones élevées du réservoir.

L'exploitation intensive des ressources géothermiques de Larderello a considérablement modifié le paysage de la région; pas seulement en le peuplant de tours de refroidissement et d'un entrelacs de conduites en aluminium mais aussi en éliminant la plupart des manifestations naturelles.

La solfatara de S. Federigo peut actuellement être considérée comme une manifestation naturelle bien qu'elle soit en fait une ancienne exploitation abandonnée.

1.3. San Federigo

La solfatara de S. Federigo (province de Grosseto) est la manifestation "naturelle" la plus spectaculaire de la zone géothermale de Larderello. Si quelques échantillons ont été prélevés dans la solfatara "sèche" située en dessus de Monterotondo ou dans diverses autres manifestations mineures, la majorité des prélèvements a été faite là. Sa localisation géographique est indiquée sur la Figure 3; la Figure 4 et les photos 2-9 donnent un aperçu de sa topologie. L'aspect de la solfatara n'a pas varié de 1982 à 1984. Cependant, au printemps '86, de nombreux changements ont été notés, probablement suite à

une petite explosion phréatique qui a modifié les positions relatives et les connexions entre les diverses pièces d'eau. Jusqu'à cette date, il a été possible de retrouver à chaque fois les lieux d'échantillonnage. Nous avons ainsi pu noter que température et pH restaient constants à l'exception des points d'eau où le niveau subissait d'importantes variations.

La solfatare de S. Federigo présente une grande variété d'environnements géothermaux: mares d'eau bouillonnante avec exutoires, chaudrons à boues, importantes nappes d'eau confinées, etc. Les pH varient de 2 à 7.5, les températures de 25 à 99°C. Les eaux sont soit franchement acides: pH 2-3, soit légèrement acides: pH 6-7. Nous n'avons pas localisé de sources alcalines. On ne retrouve donc pas à l'échelle de cette petite solfatare la même distribution bimodale des pH en fonction de la température que celle donnée par Brock (1978).

1.4. Description des points d'échantillonnage

Le Tableau 1 donne les caractéristiques des sites de prélèvement de la région de Larderello, leur pH et leur température; ces sites sont repérés sur la Fig.4 et les photos 2-9. Quand pour un même site nous disposons de plusieurs valeurs de pH et de températures, établies à des dates différentes, nous les avons toutes indiquées. La comparaison doit cependant se faire avec une certaine prudence et cela pour deux raisons principales:

- 1) La qualité des appareils de mesure n'a pas toujours été la même. Les valeurs de 1983-1984 sont, de ce point de vue là, les plus fiables ayant été établies avec un pH mètre et une sonde à température. Celles de 1982, établies avec du papier pH et un thermomètre à mercure, sont plus approximatives. C'est ainsi par exemple qu'une valeur de 6-6.5 établie au papier pH peut ne pas être significativement différente d'une valeur de 7 mesurée au pH mètre.
- 2) La localisation exacte du site ne peut-être précisée au cm près. Or, dans ces milieux, il suffit quelquefois de déplacer

le thermomètre de quelques centimètres ou de l'enfoncer un peu plus pour observer d'importantes variations de température.

Cela dit, les deux variations consécutives mesurées sont, pour la température, celles des échantillons 2 (85/69.7) et 11 (42/25). Pour l'échantillon 2, il s'agit probablement d'un problème de localisation, les points de repères n'étant pas abondants dans cette zone là. De plus, il semble y avoir dans tout ce complexe principal des relations très subtiles entre les différentes zones; alors que toutes les eaux paraissent être en contact, on mesure d'importantes différences de température et de pH d'un point à l'autre. Cette situation est certainement peu stable d'où des changements probablement fréquents des conditions de température et de pH.

Pour le site 11, l'explication réside dans l'assèchement intermittent de la source. Quand la source est tarie, la température du sédiment s'abaisse lentement jusqu'à atteindre celle de la température ambiante. Dans le même temps, l'acidité diminue progressivement. Il sembla donc que l'eau de la source ne soit que modérément chaude mais par contre très acide.

Un seul écart de pH supérieur à une unité a été mesuré, si l'on excepte le site 11, il s'agit du site 6 (5.8/4.5). La localisation du site étant assez précise et ses connexions avec d'autres zones de la solfatare peu évidentes, il est possible qu'il y eu là un changement dans la composition même de l'émanation chaude.

Dans l'ensemble, les sites ont donc peu changé sur la période de deux ans considérée. Il faut cependant noter que les mesures ont toutes été effectuées à la même période de l'année ce qui arrange peut-être les choses! Mais, comme nous l'avons mentionné plus haut, la situation au printemps '86 était complètement différente. La topologie ayant beaucoup varié, les connexions entre les différentes zones ont été profondément modifiées et il nous était quelquefois difficile de retrouver les sites précédemment étudiés. Brock (1978) note que le problème de la stabilité physicochimique est plus grand dans les aires acides où

les sources peuvent terir puis réapparaître, changer de température, présenter un chimisme modifié, sans aucune raison évidente, ceci semblant beaucoup plus rare pour les sources alcalines. Si l'on prend en considération l'ensemble des données recueillies sur le site de S.Federigo, il faut bien lui rendre raison mais, fort heureusement, aucun changement notable n'est intervenu durant la période 82-84 pendant laquelle la plus grande partie du travail sur le terrain a été effectué.

1.5. Chimisme

La concentration en soluté des sources chaudes varie beaucoup, même à l'intérieur d'une aire locale. Les eaux thermales avec moins de 500 mg TDS (total dissolved solutes) par litre sont rares. La concentration moyenne pour les eaux thermales est probablement à peine en dessous de 2000 mg TDS/l ce qui est considérablement plus élevé que les valeurs typiques pour les eaux de surface de lacs ou de cours d'eau, <150 mg/l. Cette richesse en soluté peut s'expliquer par une plus grande capacité de lessivage et de transport des eaux thermales. Les sources avec des températures inférieures à 80°C où les eaux sont entièrement d'origine météorique récente ont des salinités plus faibles, entre 200 et 400 mg/l (Castenholz 1969).

A S.Federigo, l'analyse des sels dissous a été établie pour 11 sites différents. Les valeurs sont données dans le Tableau 2. La fiabilité des analyses peut être estimée en calculant l'écart entre la somme des meq/l des cations et des anions, écart ne devant pas excéder 10 %. L'échantillon 7 est à la limite de cette valeur, l'échantillon 11 par contre, avec un écart de 20 %, n'est plus fiable. D'après le responsable des analyses, l'erreur proviendrait d'une sous-estimation des ions S^{2-} .

En comparaison, nous avons donné des valeurs mesurées pour d'autres sources thermales de type et de localisation variés ainsi que pour deux eaux "froides".

Les eaux thermales sont généralement très pauvres en nitrate, du moins à leur source, un enrichissement pouvant se faire le long d'un effluent. De l'ammonium a été trouvé dans moins de la moitié des 860 sources étudiées au Japon avec une moyenne de 1.6 mg/l, soit considérablement plus que les concentrations en nitrate (Uzamsa 1965). On retrouve à Larderello cette prédominance de l'azote sous forme ammoniacal mais les quantités en jeu sont un à deux ordres de grandeur plus élevées qu'habituellement. Cela provient du fait que les eaux de Larderello sont des condensats d'un gisement de vapeur où l'ammonium est plus concentré.

La concentration en sulfure des sources varie généralement avec le pH. Cette relation est très peu marquée pour les eaux de Larderello mais l'ion S^{2-} peut être facilement sous dosé.

Dans les sources japonaises étudiées, on a trouvé du phosphate dans seulement 36 % des sources, mais avec une moyenne de 6.5 mg/l ce qui est nettement plus que dans les eaux toscanes.

Les concentrations en sodium et surtout en chlore sont plus basses à Larderello que dans la moyenne des eaux thermale parce que la vapeur sèche à 250°C n'a pas une température suffisante pour entraîner des chlorures.

Les eaux thermales de S.Federigo ont des concentrations en macronutriments suffisantes pour permettre le développement d'organismes bactériens comme c'est le cas de pratiquement toutes les eaux thermales. Les contraintes chimiques sont plus fréquentes aux niveaux des micronutriments. Les concentrations en ions métalliques peuvent atteindre des seuils toxiques et exercer un effet sélectif. A S.Federigo, ces concentrations sont dans la moyenne de celles mesurées ailleurs avec seulement une grande abondance en acide borique.

La présence d'importantes quantités d'acide borique dans la vapeur, à Larderello, constitue un particularisme régional reconnu. Un des niveaux triasiques de la série sédimentaire toscane est composé d'évaporite (principalement d'anhydrite) très

riche en bore. Comme l'acide borique est entraîné par la phase vapeur, le passage de cette vapeur à travers les évaporites amène l'acide borique à la surface. Cet acide a été exploité pendant près d'un siècle et demi dans la région.

L'échantillon 11 se distingue notablement des autres par une concentration plus élevée en la plupart des solutés. Il est à noter qu'il s'agissait d'une mare assez profonde au niveau d'eau extrêmement variable, la température de l'eau diminue à mesure que son niveau baissait. Il est possible qu'il y ait donc un phénomène de concentration des solutés.

1.6. Minéralogie

Des échantillons lyophilisés ont été étudiés par diffraction, il s'agit d'un mélange d'eau et de boue prélevé aux sites 4, 5, 6, 9 et 11.

Les résultats sont indiqués dans le Tableau 3.

Dans la majorité des échantillons, il y a coexistence du soufre à son maximum d'oxydation (sulfate du gypse) et à son maximum de réduction (sulfure des pyrites).

Le quartz est le minéral le plus fréquent et le plus abondant. On trouve en outre deux types de micas: muscovite et phengite, d'habitude mal cristallisées et accompagnées d'interstratifiées probablement hydratées plus connues sous le nom d'illites.

Fluorapatite, zoéite et microline (feldspath potassique) ne peuvent être détectées de manière certaine avec le matériel disponible.

Tous les carbonates (calcite, dolomite, aragonite, sidérite et magnésite) sont absents. Cela est à mettre en relation avec le pH souvent très bas des sources thermales.

Les résultats d'un dosage quantitatif sont donnés dans le Tableau 4. Seuls le quartz, la pyrite et les phyllosilicates ont été dosés.

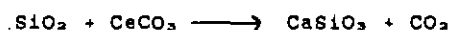
Comme ces derniers minéraux sont mal cristallisés, ils sont probablement sous-dosés.

On constate que le quartz domine dans tous les échantillons et que la pyrite est relativement abondante. L'illite est le minéral le plus important dans l'échantillon 11.

1.7. Analyse des gaz

Les gaz des manifestations hydrothermales contiennent des composants d'origine profonde, des gaz atmosphériques dissous dans l'eau du sol et d'autres composants provenant en partie de réactions avec les roches (CO₂).

Le CO₂ est généralement le gaz prédominant. Dans une région à forte anomalie thermique, sa présence peut être attribuée aux réactions métamorphiques entre silice / silicates et roches carbonatées dont l'équation la plus simple est la suivante:



Quelques données isotopiques établies en Nouvelle-Zélande suggèrent cependant qu'une partie du CO₂ pourrait également provenir de dioxyde de carbone atmosphérique entraîné en profondeur par l'eau ou/et de dioxyde de carbone provenant de la décomposition de matières organiques (Gunter et Muegrave 1966). A Larderello, le contenu en ¹³C du CO₂ paraît confirmer que ce composé provient principalement du thermométamorphisme des carbonatées sédimentaires marines (Panichi et Tongiorgi 1976, Nuti et al. 1980). Les variations locales observées dans le champ géothermal semblent néanmoins indiquer qu'il y a un mélange entre du CO₂ d'origine géothermale, riche en ¹³C, et du CO₂ d'origine organique, plus "léger" (D'Amore et al. 1977). L'apport de CO₂ d'origine organique se fait principalement dans les zones nord du champ où des failles mettent le réservoir géothermal en contact

avec du sédiment du pliocène; on explique ainsi l'appauvrissement en ^{13}C selon un gradient S,S-O / N,N-E (D'Amore et al. 1977).

On trouve fréquemment du méthane dans les gaz hydrothermaux. L'origine de ce gaz est très controversée. Craig (1953) et Hulson et Mc Cabe (1962a,b) supposent que le méthane provient de la réduction inorganique du CO_2 selon la réaction suivante:



D'autres chercheurs pensent que cette réaction n'intervient pas dans la formation du méthane, du moins pas dans les environnements géothermaux considérés (Gunter 1978, Panichi et Confiatini 1978). Le méthane serait alors d'origine organique et proviendrait du métamorphisme de la matière organique selon le modèle développé par Galimov et al. (1973).

À Larderello, le calcul des températures des réservoirs à partir des équilibres chimiques ou isotopiques de la réaction (1) donnant des résultats différant notablement, on suppose que le méthane est plutôt d'origine organique (Nutti et al. 1980). Par conséquent, le méthane proviendrait principalement de matière carbonée représentant les derniers stades de minéralisation de la matière organique.

L'oxygène est probablement d'origine atmosphérique ainsi que, évidemment, la quantité d'azote équivalant à la composition de l'air. On trouve cependant généralement un excédent d'azote lequel pourrait être d'origine magmatique (Hulson et Mc Cabe 1962a,b). D'après Marinelli (communication personnelle) cette contribution serait de l'ordre de 1 % à S.Federigo, l'excès provenant probablement de l'air dissous dans les eaux superficielles dont l'oxygène correspondant a été consommé par des substances dissoutes dans l'eau.

L'hydrogène sulfuré est présent dans la plupart des manifestations thermales, donnant à celles-ci leur odeur si typique!

L'hélium détecté à Larderello pourrait avoir trois origines différentes (Nuti 1984):

- atmosphérique
- primordiale
- radiogénique

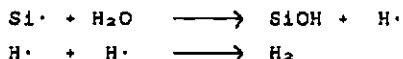
Le rapport He/Ar dans le fluide est beaucoup plus élevé que celui mesuré dans l'atmosphère (D'Amore et Trusdell 1984); cela signifie que seule une quantité minime de l'hélium peut être d'origine atmosphérique. La majeure partie provient en fait de la décomposition radioactive de l'uranium et du thorium présent dans les roches (D'Amore et Trusdell 1984, Nuti 1984).

Le Tableau 5 donne la composition des émanations gazeuses prélevées au-dessus de 10 sites. Cette composition est stable d'un échantillon à l'autre et n'offre d'autres caractéristiques importantes que l'abondance en hydrogène.

L'hydrogène est un constituant permanent de l'atmosphère, il est produit par des processus naturels et anthropogènes et consommé de manière prédominante par les sols. On a démontré que les concentrations en hydrogène dans les sols ou les eaux étaient trop faibles pour permettre sa consommation par des hydrogénobactéries (Conrad et Seiler 1979, Conrad et al. 1983a,b). Seules des microconditions locales peuvent permettre l'activité de ces bactéries. Dans les milieux géothermaux on trouve cependant l'hydrogène de manière constante et à des concentrations de l'ordre du %. A Yellowstone par exemple, cette concentration est généralement inférieure à 1 %, mais à la source "Emerald" elle atteint 4 % (Gunter et Musgrave 1966). Le long de la faille de Yamagaki, on a des concentrations de l'ordre de 3 % (Kita et al. 1982).

L'hydrogène est produit, à température élevée, par réaction entre l'eau et des radicaux chimiques tels que, $\text{Si}\cdot$ ou $\text{SiO}\cdot$ (radicaux créés par rupture des molécules de SiO_2 du quartz ou de l'opale).

On sursait les réactions suivantes (Kita et al. 1982):



Le radical $\text{SiO}\cdot$ étant stable tant que la température n'excède pas 200°C , il reste inerte et ne réagit donc pas avec le radical $\text{H}\cdot$ pour former du SiOH .

L'hydrogène pourrait également provenir d'une réduction partielle de l'eau par des minéraux ferreux des roches à haute température (D'Amore et Nutti 1977).

Il est également possible d'envisager une origine profonde pour ce gaz. Dans les bulles microscopiques contenues dans les cristaux de diamant, on trouve en effet jusqu'à 76 % de H_2 et 36 % de CH_4 (Melton et Giardini 1974a,b).

1.8. Carbone organique

La teneur en carbone organique d'échantillons lyophilisés est donnée dans le Tableau 6.

Tous les échantillons sauf un ont des teneurs en Corg inférieures à 1 %.

Pour l'échantillon 9b, la présence d'un supplément de matière organique s'explique aisément de par la proximité d'un petit dépôt sauvage d'ordures. Alors que la source (9a) n'est que peu contaminée, l'effluent (9b) présente environ 4-5 fois plus de Corg que les autres échantillons.

Ces faibles valeurs laissent supposer que la production primaire est probablement assurée par des bactéries autotrophes qui

fournissent la matière organique nécessaire au développement des organismes hétérotrophes. Ceux-ci sont peut-être également à même de se développer au dépens de matière organique allochtone.

1.9. Consommation d'hydrogène

Il a été montré (Conrad et Seiler 1979, Conrad et al. 1983a) que les hydrogénobactéries n'étaient pas responsables de l'oxydation de l'hydrogène mesuré dans les sols, l'eau ou l'atmosphère. Le seuil de concentration d'hydrogène utilisable par les hydrogénobactéries est supérieur à $1 \mu\text{l/l}$ alors qu'en moyenne on a des concentrations en hydrogène de $0.56 \mu\text{l/l}$ dans l'atmosphère, de moins de $0.01 \mu\text{l/l}$ dans la phase gazeuse des sols et de $0.04 \mu\text{l/l}$ au plus dans les eaux (H_2 extrait dans une phase gazeuse inerte). Qui plus est, le K_m apparent mesuré chez les hydrogénobactéries, $>1 \mu\text{M H}_2$, est bien supérieur à celui mesuré pour la consommation d'hydrogène dans les sols ou les lacs ($11-83 \text{ nM H}_2$) (Conrad et al. 1983a). Cela signifie que les hydrogénobactéries ne sont pas capables d'utiliser l'hydrogène présent dans ces milieux, sauf pendant de courtes périodes où la concentration en hydrogène augmente transitoirement ou alors en profitant de microconditions locales, p.ex. aux voisinages de fixateurs d'azote - cyanobactéries ou symbiotes de plantes.

Dans les milieux géothermaux où la concentration en hydrogène est quelquefois de plusieurs pourcents, la situation se présente différemment. Schink et al. (1983) ont d'ailleurs montré que dans les sites géothermaux, la consommation biologique de l'hydrogène était tout à fait significative.

Nous avons donc décidé de mesurer la consommation d'hydrogène dans deux sites de la solfatare de San Federico afin de pouvoir estimer l'importance des hydrogénobactéries dans ce processus. Cette recherche a été possible grâce à la collaboration du Dr. Conrad, elle a été consignée par Conrad et al. (1985a).

L'évolution de la teneur en hydrogène a été mesurée pour des échantillons provenant des sites 5 et 9.

Les caractéristiques chimiques de ces sites ont été données dans le Tableau 2.

Les teneurs en oxygène et en hydrogène dissous sont données dans le Tableau 7. En comparaison, nous donnons les valeurs mesurées à Yellowstone (Schink et al. 1983).

A cause de la température élevée de l'eau, les coefficients de solubilité de ces deux gaz sont très bas si bien que les concentrations in situ sont faibles malgré le contact avec l'atmosphère et un gazage intensif avec les gaz fumarolliens contenant ~4 % H_2 .

Les concentrations en oxygène dissous données dans le tableau 7 sont indicatives car il a fallu attendre le refroidissement de l'échantillon avant de pouvoir utiliser l'électrode à oxygène, refroidissement pendant lequel de l'oxygène atmosphérique a pu se dissoudre. La teneur en hydrogène dissous représente elle une limite inférieure car une partie de l'hydrogène initialement présent a pu être consommé après l'échantillonnage et cela malgré l'inactivation provoquée par le refroidissement et l'adjonction d'un inhibiteur.

Quand les échantillons sont incubés à 60°C, la teneur en hydrogène dissous diminue avec le temps. La consommation d'hydrogène est supprimée par l'adjonction de NaOH mais seulement partiellement inhibée par celle de $HgCl_2$ (Fig.5). Le chlorure de mercure n'est donc pas un bon inhibiteur pour ces eaux là, contrairement à ce qui avait été observé par Schink à Yellowstone (Schink et al. 1983). On peut supposer que le mercure précipite avec les sulfures présente dans l'échantillon ce qui annule son effet inhibiteur. Il apparaît cependant nettement que la consommation d'hydrogène est liée à des activités biologiques.

Nous n'avons jamais observé de production d'hydrogène durant les expériences d'incubation, même quand l'hydrogène dissous a été précédemment soutiré par extraction. Une production d'hydrogène

comme celle rapportée pour les eaux chaudes d'évents hydrothermaux sous-marins (Baross et al. 1982) n'a donc pas pu être démontrée.

A cause de la faible concentration in situ d'oxygène, les expériences ont été menées aussi bien en conditions aérobies que anaérobies; les candidats pour une consommation anaérobie de l'hydrogène étant les bactéries méthanogènes et sulforéductrices, les hydrogénobactéries pour la consommation aérobie.

La Figure 5 montre les résultats obtenus sur le site 9. Dans ce site, la consommation anaérobie de l'hydrogène est six fois plus active que la consommation aérobie. Dans le site 5, au contraire, la consommation aérobie prédomine (Tableau 8). La température du site 5 est inférieure à celle du site 9 (Tableau 1), la solubilité de l'oxygène y est par conséquent meilleure, ce qui pourrait expliquer que la consommation aérobie de l'hydrogène y soit prédominante.

Dans une certaine mesure cependant les activités aérobies et anaérobies de consommation d'hydrogène coexistent dans la même eau. Les valeurs obtenues - en conditions aérobies - sont comparables à celles mesurées à Yellowstone (radio-essai) (Tableau 8). Cependant, les différences de méthodologie rendent toute comparaison délicate.

Quoiqu'une analyse détaillée doive être effectuée, il est logique de conclure que la consommation d'hydrogène peut être expliquée par les propriétés cinétiques des hydrogénobactéries (bactéries méthanogènes et sulforéductrices en conditions anaérobies).

1.10. Quantification des hydrogénobactéries

Le Tableau 9 donne les MPN déterminés sur les 11 sites de la solfatare de S. Federigo dont les caractéristiques physicochimiques ont précédemment été données.

Comparées au 45.10^3 - 95.10^3 cell/g de vase obtenu lors des numérations dans le Loclat (Schweitzer et Aragno 1975), ces valeurs sont très faibles. Ceci pourrait éventuellement provenir de problèmes "techniques":

- Après cinq jours d'incubation, les échantillons ont dû être réfrigérés pour être transportés en Suisse. L'incubation n'a pu être poursuivie que 24h plus tard.
- Les cultures ont été faites en éprouvettes. Il est apparu par la suite que la croissance des hydrogénobactéries thermophiles était souvent médiocre dans ces conditions.

Si ces deux facteurs sont susceptibles d'amener à une sous-estimation de la valeur du MPN, ils n'expliquent probablement pas l'écart observé entre les valeurs mesurées au Loclat et à S. Federigo. Il semble donc qu'il y ait réellement une relative rareté des hydrogénobactéries dans ces milieux géothermaux. Ceci est corroboré par les valeurs établies en Islande par Kristjansson et al. (1985) qui dénombrent une moyenne de 5400 hydrogénobactéries/100ml de sédiment. Schink et al. (1983) obtiennent respectivement 2300 et 28 000 cell./100 ml sur les deux sites de Yellowstone qu'ils ont étudiés. Dans les deux cas, on est donc assez proche des valeurs moyennes mesurées à Larderello.

Quels sont donc les facteurs qui limitent la croissance des hydrogénobactéries? La pauvreté en matière organique semble un facteur important. Les échantillons 9a et 9b sont à cet égard significatifs. L'échantillon 9b est contaminé par de la matière organique en provenance d'une décharge voisine, on y trouve cinq fois plus de bactéries que dans les autres échantillons; l'échantillon 9a est une petite source bouillonnante donnant naissance à un ruisseau à faible débit (9b), un échantillon prélevé au centre du bouillonnement est peu susceptible d'avoir été significativement contaminé par les matières organiques avoisinantes et de fait, on n'y trouve pas d'hydrogénobactéries.

Il est évident qu'en absence presque totale de matière organique, seule des autotrophes obligatoires peuvent se développer; étant donné que de telles bactéries existent (VPL) il reste étonnant qu'elles ne soient pas plus nombreuses.

Le problème de la concentration en oxygène se pose également: les hydrogénobactéries sont microaérophiles et donc assez exigeantes quant aux concentrations en oxygène. A haute température, la solubilité de l'oxygène est extrêmement réduite et il est difficile de savoir dans quelle mesure le brassage permanent et souvent vigoureux auquel sont soumises les sources permet d'établir des concentrations en oxygène suffisantes. Le gazage continu par un mélange de gaz dépourvu d'oxygène abaisse encore la concentration en O_2 dissous.

Il convient de remarquer que toutes les croissances positives obtenues ne sont pas forcément dues à des hydrogénobactéries; il est possible que d'autres bactéries se développent pendant quelques générations dans les conditions d'incubation choisies, p.ex. des sulfoxydantes utilisant les composés soufrés présents dans l'inoculum.

1.11. Mesure de l'ATP

L'ATP est une molécule présente de façon universelle et univoque chez les organismes vivants. La teneur en ATP cellulaire est maintenue entre des valeurs assez étroites. A cause de cette régulation, sa concentration cellulaire n'est que faiblement corrélée à l'état physiologique de la cellule. Sa mesure nous donne donc une estimation de la biomasse vivante, peu tempérée par l'activité (Maire 1983).

Il nous a paru intéressant de mesurer la teneur en ATP des sols et des eaux de S. Federigo afin d'avoir une idée approximative de l'importance de la biomasse. Malheureusement, les résultats obtenus, consignés dans le Tableau 9, nous montrent bien que les méthodes mises au point pour des sols "banals" ne peuvent être

extrapolée sans autre aux sols des champs fumeroiliens.

D'une manière générale, les pertes - estimées par dosage - sont conséquentes, mais surtout elles sont extrêmement disparates; on a même la situation extrême - et absurde! - des échantillons 1.1 et 3.1 où la différence (échantillon dopé - échantillon non dopé) excède la valeur du dosage! Ce qui n'incite pas à l'optimisme quant à la valeur des résultats obtenus!

Globalement, les valeurs sont faibles, il a même fallu travailler avec une enzyme purifiée (luciférase) pour atténuer le bruit de fond qui gênait la mesure. Avant d'attribuer une valeur biologique à cette faible concentration, il convient de souligner que la méthode d'extraction utilisée n'a pas été optimisée et que les valeurs obtenues ne sont peut-être que des concentrations minimales. Ceci dit, avec des valeurs moyennes n'excédant pas 100 ng/ml(mg), nous avons des concentrations au moins dix fois plus faibles que celles mesurées dans des sols. Il semble donc que la biomasse soit faible ou peu active, mais cette assertion nécessite de sérieuses vérifications.

1.12. Enrichissement

Le Tableau 10 donne les souches isolées ou au moins les enrichissements positifs en regard du site d'échantillonnage, pour la région de Larderello. Sur la Figure 6, nous avons représenté le succès ou l'échec des enrichissements en fonction des conditions de température et de pH. Il est possible de tirer une droite qui sépare presque parfaitement les enrichissements positifs et négatifs. Seuls deux points sont nettement en dehors de cette séparation soit: le point 10 (86°C; 6), c'est à dire l'étang de Lago qui ne fait pas à proprement parler partie de la colfatare de S.Federigo et où d'autres facteurs sont susceptibles d'intervenir (p.ex. le chimisme) et le point 1.5 (60.7°C; 6.2-6.5) qui est un des rares points à avoir été échantillonné une seule fois ce qui laisse à penser qu'il s'agit peut-être d'un échec accidentel.

On constate donc que les hydrogénobactéries sont d'autant moins thermophiles qu'elles sont acidophiles (et vice et versa). A pH 2, la température maximale à laquelle on trouve encore des bactéries est d'environ 40°C; à pH 4, elle approche 70°C alors que les bactéries sont encore présentes dans de l'eau en ébullition (98°C) si son pH est inférieur à 6.

Les données établies ne sont pas assez nombreuses pour généraliser ce résultat; toutefois, cette relation pH-température a déjà été établie par Brock et Darland (1970). Ces chercheurs ont testé la présence de microorganismes dans les sources d'Islande, de Nouvelle-Zélande et des USA (principalement à Yellowstone). Les échantillons ont été examinés au microscope, les résultats obtenus sont donc représentatifs de la population bactérienne totale et non d'un groupe physiologique particulier. On retrouve cependant la même relation mais avec des limites décalées soit: une température maximale de 70°C pour une vie à pH 2; supérieure à 80°C à pH 4; pour les pH neutres et alcalins la vie semble possible jusqu'au point d'ébullition de l'eau. On s'assure qu'il ne s'agit pas d'une contrainte chimique en vérifiant cette "loi" le long d'un effluent acide (pH et chimisme - constant, température diminuant régulièrement).

Il semble donc qu'il soit impossible aux bactéries en général mais plus spécialement aux hydrogénobactéries d'affronter un environnement qui soit à la fois très chaud et très acide. Ces deux stress paraissent agir de façon synergique pour lancer un défi à la vie que seules de très rares espèces (Sulfolobus) sont à même de relever.

L'écart entre les températures maximales de croissance en fonction du pH établies par Brock et Darland (1970) et celles que nous avons mesurées peut s'expliquer soit par un manque de données de notre part (une vingtaine de points contre 300!) soit par la spécificité plus étroite de nos analyses puisque nous ne testons qu'un seul groupe métabolique, les hydrogénobactéries, qui est peut-être plus susceptible à ces contraintes que l'ensemble de la population bactérienne.

2. Autres régions géothermales/volcaniques

Les enrichissements positifs obtenus ailleurs qu'à Larderello sont consignés dans le Tableau 11.

2.1. Région de Naples

La localisation des sites d'échantillonnage de cette région est repérée sur la Fig.7.

- Solfatara de Picciarelli

Dans cette solfatare très acide, $\text{pH} < 1.5$, avec des températures supérieures à 70°C , nous n'avons pas pu isoler d'hydrogénobactéries. Si l'on se réfère à la Fig.6 établie dans la région de Larderello, il semble que cet insuccès soit dû aux conditions de pH et température puisque nous sommes dans un domaine ne permettant pas la croissance.

- Agnano

Cette station de cure présente encore de nombreuses manifestations plus ou moins naturelles: ruissaux, fontaines, bassin pour boues thermales etc. Tous les enrichissements réalisés y ont été positifs.

- Thermes de Capetta, Rosapeppe, Capasso (Région de Contursi)

Les prélèvements effectués sur ces sites n'ont pas permis d'isoler d'hydrogénobactéries thermophiles, peut-être à cause de leur température assez basse ($30-47^{\circ}\text{C}$), mais plus probablement à cause de leur concentration élevée en H_2S .

- Lac de Fusaro (Ouest de Pozzuoli)

Conditions et résultats similaires aux thermes ci-dessus.

- Stufe di Nerone

L'échantillon prélevé à la source ($>50^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7$) a été positif.

2.2. Vésuve

Un prélèvement unique mais fructueux a été effectué dans une fumerolle sur le Vésuve (Fig.1), seul endroit un peu humide (eau provenant de la condensation de vapeurs fumerolliennes).

2.3. Etna

En 1981, un échantillon ramené de l'Etna (Fig.1) a permis d'isoler une hydrogénobactérie.

Ce prélèvement a été fait près d'une fumerolle existant depuis de nombreuses années mais recouverte à l'époque de cendres provenant d'une éruption récente. Cette fumerolle a disparu après l'éruption de '83 qui l'a ensevelie sous de la lave.

Les divers prélèvements effectués en 1984, représentatifs de conditions variées ont tous été négatifs.

Une nouvelle fumerolle est apparue en '86. Apparemment elle n'a pas encore été "colonisée" car aucun des échantillons effectués à proximité n'a été positif.

2.4. Les Iles Eoliennes (Vulcano)

De nombreux échantillons ont été prélevés sur l'île de Vulcano (Fig.1) dans quatre types d'environnements distincts; les échantillons sont donc très variés, on a :

- Des échantillons très acides, pH 1.5-3.5 avec des températures de 45-75°C.
- Des échantillons de pH 3-4 avec des températures variant de 26 à 65°C et dont la localisation à quelques mètres de la plage laisse supposer qu'ils sont constitués d'un mélange d'eau de mer et d'eau de source.

- Des échantillons faiblement acides prélevés en mer au-dessus d'un évent ($\approx 120^{\circ}\text{C}$).
- Des échantillons prélevés dans des fumerolles sur le bord du cratère actif de La Fossa, en milieu acide et sec (dégagement de SO_2).

Des isollements ont été tentés en ces différents endroits à deux reprises mais sans succès. En fait, la majeure partie des échantillons est dans une zone pH-température peu favorable. Les plus susceptibles d'abriter des hydrogénobactéries ont une concentration en sel se rapprochant de celle de l'eau de mer (3 %); il y a là une contrainte supplémentaire peut-être responsable de l'absence d'hydrogénobactéries.

Aucune recherche n'a été faite jusqu'à présent dans le grand champ fumerollien près du cratère de l'île de Stromboli.

2.5. Islande

Plusieurs échantillons ont été ramenés d'Islande depuis les régions suivantes:

- Landmannalaugar; Geysir; lac Myvatn, SO de Reykjavídh; solfatars de Namafjall; Heimaey; Reykholt; sources de Burgharbak et de Kleppjarnereykir; solfatars de Krisuvík, région de Hveragerði (Fig.8).

Les échantillons positifs sont donnés dans le Tableau 11. Notons que les conditions de transport et de conservation n'ont pas été optimales. Malgré tout, la rareté des échantillons positifs (Tableau 11) est surprenante vu les conditions généralement favorables de pH et température. De plus, on a détecté, de manière semi quantitative, de l'hydrogène dans plusieurs des sites de prélèvement: 5 % à la solfatars de Namafjall; 2-5 % à Krisuvík; 0.5 % dans la région de Hveragerði.

3. Bilan

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons tenter d'établir un bilan des caractéristiques et de l'intérêt biologique des milieux géothermaux - et volcaniques -. Le plupart des remarques s'appliquent plus spécifiquement à la solfatara de S.Federigo mais peuvent certainement être extrapolées sans modifications majeures.

Nous avons vu que les milieux géothermaux présentent une certaine variété de conditions physicochimiques avec, dans les régions étudiées, prédominance d'environnements chauds et acides. Ces milieux apparaissent relativement stables, pauvres en matière organique mais dotés de tous les macronutriments indispensables à la vie. Ces conditions doivent favoriser le développement de bactéries autotrophes obligatoires ou à prédominance autotrophe. Leur teneur élevée en hydrogène les rend particulièrement intéressants pour l'étude des hydrogénobactéries. Même si leur nombre, déterminé par la technique du MPN, est faible, de nombreux enrichissements positifs ont pu être réalisés. Dans un milieu donné, le succès des enrichissements est lié aux valeurs de pH et température des lieux d'échantillonnage.

La consommation in situ d'hydrogène est compatible avec une activité biologique ce qui atteste l'importance des hydrogénobactéries dans ces milieux. La population totale y est cependant faible (mesure de l'ATP) et, vu leur grande sélectivité et leur pauvreté en niches écologiques, il en est probablement de même pour la diversité spécifique, mais ceci demande à être vérifié.

L'étude taxonomique des bactéries isolées fait l'objet de la suite de ce travail. Nous verrons dans quelles mesures les particularités de leurs habitats ont des répercussions sur leur métabolisme et leur évolution.

V LE GENRE HYDROGENOBACTER

14 1 1

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction, les hydrogénobactéries ont toujours été considérées comme un groupe physiologique ne contenant pas d'autotrophes obligatoires, cela contrairement à ce que l'on observe chez d'autres chimolithotrophes (bactéries nitrifiantes ou sulfooxydantes p.ex.). La capacité de fixer le CO_2 et d'utiliser l'hydrogène moléculaire était considérée comme un atout supplémentaire conférant un avantage à la bactérie dans les rares cas où la concentration en hydrogène est suffisante pour permettre son utilisation.

Il nous est cependant rapidement apparu que les souches thermophiles non sporulantes isolées de Toecene (et de quelques autres régions d'Italie) étaient susceptibles de présenter un métabolisme à prédominance autotrophe, voire une autotrophie obligatoire.

Les conditions rencontrées dans les manifestations géothermales (pauvreté en carbone organique, abondance en hydrogène) alliées à l'absence de mécanismes de résistance (spores, kystes) contraignent en effet ces bactéries à une croissance lithoautotrophe, sinon obligatoirement du moins préférentiellement.

Les essais d'utilisation de substances organiques ont rapidement confirmé cette hypothèse.

L'autotrophie obligatoire de ces nouvelles souches, quoique prévisible, nous a cependant surpris; il y a des concepts bien ancrés dans les esprits et l'autotrophie facultative des hydrogénobactéries était de ceux-là!

Au cours de ce travail, nous avons pris connaissance de trois descriptions de bactéries présentant des caractéristiques similaires à celles des souches étudiées à savoir: hydrogénobactéries thermophiles isolées d'environnements géothermaux, non sporulantes, incapables de se développer en conditions hétérotrophes. Nous avons pu nous procurer quelques-unes de ces souches et les inclure dans notre étude; il s'agit de:

- Hydrogenobacter thermophilus (Kawasumi et al. 1984)
 - TK-6, souche type
 - TK-H
 - TK-G
- Calderobacterium hydrogenophilum (Kryukov et al. 1983)
 - Z-829, souche type
- Hydrogenobacter sp. (Kristjansson et al. 1985)
 - H-1
 - H-12
 - HvH27

Dans une étude comparative, nous avons répété avec ces souches certaines expériences faites avec les souches de Toscane. Dans ce cas, nous donnons les résultats obtenus sans autre indication. Quelques résultats ont été tirés de la littérature, auquel cas ils seront suivis d'un astérisque. Les références correspondant à chaque souche sont données ci-dessus et ne seront plus répétées.

Il va de soi que, travaillant avec des autotrophes obligatoires appartenant au même groupe physiologique, le set de tests phénotypiques discriminatifs est considérablement réduit. C'est pourquoi nous commencerons cette étude par une caractérisation génotypique qui nous permettra de cerner les différents groupes en présence et justifiera le choix de quelques-unes de ces souches pour les tests phénotypiques.

A) RESULTATS

Dans cette première partie, nous donnerons les résultats obtenus avec quelques commentaires succincts. Les données les plus intéressantes seront reprises dans la seconde partie (B) pour être discutées plus en détail.

1. Souches étudiées

Pour cette étude des souches apparentées au genre Hydrogenobacter, nous avons pris en considération toutes les hydrogénobactéries thermophiles, non sporulantes, incapables de se développer en conditions hétérotrophes et ayant un % G + C d'environ 40 %.

Le liste de ces souches est donnée dans le Tableau 12 avec, en rappel, les sites d'échantillonnage (voir aussi Tableaux 10 et 11); nous indiquons également l'origine des souches TK-6, H-1 et Z-829, étudiées en parallèle.

Le cas de MF3, autotrophe facultatif, sera traité plus en détail; cependant, des études ultérieures ont justifié son intégration dans ce groupe.

Dans un souci de concision, ces souches seront globalement désignées comme Hydrogenobacter, postulat que nous justifierons dans le suite de ce travail.

La distribution géographique approximative de ces souches est donnée dans le Figure 9.

2. Pourcentage guanine + cytosine

Le pourcentage G + C des différentes souches est donné dans le Tableau 12. La similarité des valeurs obtenues constitue un des critères nous ayant permis de ne pas exclure une parenté entre

les souches. Les différences entre les valeurs G + C mesurées par nos soins et celles relevées dans la littérature sont facilement explicables par des variations plus ou moins importantes dans les méthodes de détermination utilisées (on sait qu'un écart d'environ 5 % n'a de signification que si les mesures ont été faites dans les mêmes conditions, voire dans le même laboratoire et par le même chercheur!).

Il est de peu d'importance de déterminer quelles sont les mesures les plus proches de la réalité puisque seules les comparaisons et une bonne estimation nous intéressent. Pour ce faire, les valeurs que nous avons mesurées sont donc les plus adéquates.

Toutes les valeurs obtenues sont comprises dans une fourchette assez étroite allant de 37.5 à 40.3 % G + C.

Ces valeurs assez basses distinguent radicalement ces bactéries des hydrogénobactéries déjà décrites (voir discussion) et infirment une fois de plus la relation entre une vie à haute température et une teneur élevée en guanine + cytosine.

3. Pourcentages d'homologie ADN-ADN

Comme l'équivalence de % G + C n'implique pas forcément une parenté étroite, il convenait d'affiner cette première approche par des séries d'hybridations ADN-ADN.

Les pourcentages d'homologie ADN-ADN sont donnés dans le Tableau 13.

Nous avons choisi de travailler dans des conditions très sélectives en mesurant la vitesse de réassociation à 70°C ce qui est élevé pour des souches ayant un % G + C d'environ 40 % ($T_m - 5^\circ\text{C}$). En mesurant ces valeurs à 60°C ($T_m - 15^\circ\text{C}$) nous obtenons des pourcentages d'homologie de 10 % supérieurs, en moyenne. Cependant, à cette température, les courbes de réassociation sont beaucoup moins bonnes et les estimations d'homologie plus imprécises.

Les résultats obtenus sont d'une netteté frappante. Visiblement, ces bactéries doivent être scindées en cinq groupes.

A l'intérieur de ces groupes, les valeurs d'homologie dépassent 70 % alors qu'entre deux groupes elles sont inférieures à 20 % (voir aussi dendrogramme, Fig.10).

Nous avons les groupes suivants:

- Un premier groupe de souches isolées de Toscane:
T3, T4, P4, P9, P10.
- Un deuxième groupe de souches isolées non seulement de Toscane, mais aussi d'autres régions d'Italie:
T5, T13, T171, T181, T191, 102, MF3.
- Un groupe de souches isolées au Japon:
TK-6 (Hydrogenobacter thermophilus, souche type), TK-H, TK-G.
- Une souche en provenance d'Union Soviétique:
Z-829 (Calderobacterium hydrogenophilum, souche type)
- Un groupe de souches isolées en Islande:
H-1, HvH27.

La réalité de ces cinq groupes une fois établie, nous avons tenté de retrouver dans les caractères phénotypiques la signature de ces différents génotypes.

Les résultats les plus significatifs de cette étude phénotypique sont consignés dans le Tableau 14.

4. Morphologie

Toutes les souches sont des bâtonnets non sporulants, non mobiles, montrant une tendance à former des filaments, surtout aux températures supraoptimales. Les faibles variations de dimensions entre les souches étudiées (Tableau 14) ne sont à

notre avis pas significatives et sont à corrélérer avec les variations observées en fonction de l'état physiologique des cellules. De plus, ces variations concernent surtout la longueur des cellules, paramètre beaucoup plus variable que le diamètre qui lui constitue une mesure moins aléatoire.

Les photos 10 et 11 montrant l'aspect des souches T3 et T13.

5. Ultrastructure

La paroi bactérienne est de type Gram négatif et en présente la structure typique (photo 12). Cette structure suggère l'appartenance de ces bactéries au règne des Eubactéries.

Aucune membrane interne ne peut être observée comme c'est généralement le cas chez les hydrogénobactéries.

6. Culture en milieu liquide non agité

En bouteille et en conditions autotrophes, la croissance est bonne et relativement rapide (DO = 2 en 5-7 jours).

Il est également possible de cultiver ces bactéries dans des flacons de Fernbach, flacons présentant un grand rapport surface/volume; l'inoculation de 500 ml permet dans ces conditions de récolter ~ 1g de cellules (poids frais).

La croissance en éprouvette est très faible; il est probable qu'à 60°C, la diffusion de l'oxygène dans le tube n'est pas assez forte pour assurer une oxygénation optimale (voir discussion).

Les cultures âgées tendent à former des agrégats.

7. Croissance en fermenteur, taux de croissance

Le graphe de la Figure 11 donne la courbe de croissance de la souche T3 établie en conditions H_2 -lithotrophes à 65°C.

Le démarrage de la culture est facilité si l'on débute avec une faible concentration en oxygène que l'on ajuste progressivement, soit en augmentant le pourcentage d'oxygène dans la phase gazeuse, soit en augmentant la vitesse d'agitation.

Le pH est maintenu constant par adjonction de NH_3 concentré quand nécessaire.

Dans ces conditions, le taux de croissance mesuré est de 0.3 pour T3 et de 0.33 pour MF3; Le taux de croissance d'Hydrogenobacter thermophilus est de 0.35 et donc très proche.

8. Culture en milieu solide

a) Conditions autotrophes sur agar.

Aucune des souches n'est capable de se développer sur milieu solide en conditions H_2 -lithoautotrophes. Les précautions prises pour éviter le dessèchement des boîtes de Pétri nous ont permis de prolonger l'incubation pendant plusieurs semaines, mais sans résultat.

Kriatjansson et al. (1985) ont montré que leurs souches étaient inhibées par des concentrations d'agar allant de 0.5 à 2 g/l. Cela pouvait signifier que l'absence de croissance sur milieu solide était due à l'action de la substance gélifiante plutôt qu'au mode de croissance.

Nous avons donc essayé de substituer à l'agar une autre substance gélifiante.

b) Conditions autotrophes sur gélrite

Sous le nom commercial de gélrite, on désigne un agent gélifiant formant, après chauffage et refroidissement, un gel clair dont la force est contrôlée par la concentration en cations bivalents tels que le magnésium et le calcium. Ce

produit est obtenu à partir d'un hétéropolysaccharide bactérien, le PS-60, produit par un Pseudomonas (Kang et al. 1982). La supériorité de la gelrite sur l'agar lors d'incubation à hautes températures a été mise en évidence par Lin et Casida (1984): meilleure stabilité, meilleure transparence et, sauf exception, meilleure croissance.

Vu les atouts que semblaient réunir ce nouvel agent gélifiant, nous l'avons utilisé pour la confection de milieux solides.

Les essais effectués sont résumés dans le Tableau 15.

Le milieu de Schlegel étant riche en ions, il y a interférences lors de l'ajout de nouveaux cations, p.ex. formation de précipités. En complétant le MMB avec 8 g/l de gelrite et 1 g/l de CaCl_2 , on obtient un gel mou sur lequel une croissance H_2 -lithotrophe est possible. Avec 8 g/l de gelrite et 0.4 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, on obtient une gélification du MMB sensiblement de même qualité qu'avec 1.5 % d'agar. Dans ce cas, la croissance n'est pas possible.

C'est donc bien la nature solide du milieu qui inhibe la croissance. L'agent gélifiant n'est pas en cause puisque la croissance sur milieu "semi-solide" reste possible.

c) Conditions mixolithotrophes sur agar

Ce n'est que récemment que la possibilité d'utiliser le thiosulfate comme source alternative d'énergie et d'électrons a été mise en évidence (voir point 14). Alfredsson et al. (1986) ont rapporté que, cultivés en tant que sulfoxydants, les Hydrogenobacter étaient capables de se développer sur milieu solide en formant des colonies jaune-brillantes, dues à l'accumulation de soufre. Notre propre expérience nous a incité à faire cet essai en conditions mixolithotrophes, c'est à dire en présence simultanée d'hydrogène et de thiosulfate. On obtient ainsi des colonies beige-jaunâtre (le dépôt de soufre est moins important dans ces conditions) aux bords diffus.

Les modalités de croissance de ces souches trahissent une sensibilité particulière à la concentration en oxygène. Nous reviendrons plus en détail sur ce point dans la discussion.

9. Températures cardinales

L'incubation des souches à l'aide d'un appareil à gradient de température nous a permis de déterminer les températures cardinales de croissance données dans le Tableau 16.

L'appareillage utilisé ne nous permettait pas de réaliser les cultures dans des conditions optimales: gazage non continu, consommation rapide de l'oxygène disponible, pH non contrôlé, culture en éprouvette... les DO obtenues sont donc faibles mais permettent néanmoins une comparaison.

La valeur des températures extrêmes a été établie dans des expériences séparées permettant des incubations prolongées.

La souche P10 et toutes celles qui lui sont apparentées présentent une thermophilie légèrement supérieure aux autres souches. Si l'optimum de croissance est tout à fait comparable (70-75°C), le maximum est plus élevé. Les souches de ce groupe sont les seules à présenter une bonne croissance à 80°C (Fig. 12 et Tableau 16).

La signification écologique et taxonomique de ce caractère sera reprise dans la discussion.

10. Optimum de pH

Toutes les souches testées sont neutrophiles avec un optimum aux environs de 7.4 pour la souche MF3 cultivée en conditions hétérotrophes (Fig. 13).

La croissance est possible depuis un pH d'environ 5, jusqu'à un pH de 8.

Ces valeurs sont légèrement décalées par rapport à celles obtenues pour Hydrogenobacter sp. (Kristjansson et al. 1985) qui sont: optimum 6.5, limites de croissance 4.0-7.5. Les valeurs ayant été établies dans d'autres conditions, elles peuvent être considérées comme non significativement différentes.

11. Tolérance à divers composés

11.1. Tolérance au NaCl et à la glycine

Les bactéries étudiées se sont révélées très sensibles à la pression osmotique. Quoique isolées de milieux relativement riches en sels dissous, elles ne supportent pas l'adjonction de 1 % NaCl dans le milieu de culture. L'échec des tentatives d'isolement en eau saumâtre n'est peut-être pas sans rapport (voir chapitre IV).

L'adjonction de 1 % glycine inhibe également la croissance.

11.2 Tolérance à l'acide borique

Les concentrations en acide borique mesurées en Toscane sont d'environ 3 g/l (Tableau 2). Nous avons essayé de voir quel était l'effet de l'adjonction de cet acide au milieu de culture, d'une part pour les souches isolées de Toscane, d'autre part pour les autres souches d'Hydrogenobacter. Une bactérie mésophile, Alcaligenes eutrophus (ATCC 17699) a été étudiée en comparaison.

Le Tableau 17 donne la densité optique finale des cultures en fonction de la concentration en acide borique. Pour faciliter la comparaison, les résultats ont été normalisés en ramenant à 1 la valeur de la DO mesurée dans le milieu témoin (0 g/l de H_3BO_3).

D'une manière générale, les souches toscanes ne sont pas mieux adaptées que les autres thermophiles aux hautes concentrations en acide borique, mais il est très frappant de constater que la

souche mésophile y est beaucoup plus sensible. On retrouve par ailleurs cette bonne tolérance à l'acide borique chez d'autres thermophiles comme Bacillus schlegelii et B. acidocaldarius dont la croissance n'est pas influencée par la présence de 3 g/l d'acide borique (résultat non quantifié).

11.3. Sensibilité à la pénicilline

La pénicilline étant thermolabile, nous avons mesuré les concentrations n'induisant pas de retard à la croissance (Schenk et Aragno 1979).

Toutes les souches sont sensibles à l'action de la pénicilline comme l'indiquent les concentrations minimales inhibitrices notées dans le Tableau 14. Cette sensibilité traduit bien l'appartenance de ces bactéries au règne des Eubactéries. Il s'agit certes d'une preuve indirecte, mais jointe à l'observation des structures de la paroi, cela peut être considéré comme suffisant.

12. Sources d'azote

12.1. Sources d'azote combiné

La capacité d'utiliser ou non certains composés azotés est donnée dans le Tableau 14.

L'ammoniaque est la meilleure source d'azote pour ces bactéries. Du point de vue écologique, cela est conséquent avec les données des analyses chimiques qui indiquaient la richesse du milieu en ce composé (Tableau 2). L'urée et l'asparagine peuvent également être utilisés. L'utilisation des nitrates semble plus aléatoire, il est possible que les conditions d'expérimentation - p.ex. le milieu - jouent un rôle. Le nitrite n'est pas utilisé.

12.2. Fixation d'azote

Ainsi que nous l'avons souligné dans le chapitre II, la fixation d'azote aux très hautes températures n'a jamais été observée. Comme cela ne signifie pas pour autant qu'elle soit impossible, nous avons jugé indispensable de vérifier la possibilité que les Hydrogenobacter puissent fixer l'azote moléculaire.

Les tests présomptifs de l'utilisation de l'azote gazeux - culture en milieu dépourvu d'azote combiné sous atmosphère microaérophile enrichie en azote - se sont révélées négatives. Ces résultats ont été confirmés par l'absence de réduction de l'acétylène par les souches P4, P9 et MF3. Ces souches ont été cultivées en présence d'azote gazeux dans un milieu contenant un faible pourcentage d'extrait de levure afin d'avoir un minimum de croissance.

13. Sources de carbone

Les souches toscanes sont incapables de métaboliser les substrats suivants: L(+) arabinose, D(+) cellobiose, D(-) fructose, D(+) galactose, D(+) glucose, D(+) maltose, D(+) mannose, L(+) rhamnose, D(+) saccharose, D(+) sorbose, D(+) tréhalose, D(+) xylose, acétate, benzoate, butyrate, α -cétoglutarate, citrate, formiate, D gluconate, malate, malonate, mesaconate, oxalate, oxaloacétate, pyruvate, D(+) L(-) et méso-tartrates, succinate, DL-alanine, L-arginine, D et L-aspartates, L-cystéine, D-glutamate, glycine, L-histidine, L-isoleucine, L-méthionine, L-phénylalanine, L-proline, L-sérine, L-tryptophane, L-valine, butanol, éthanol, D(-) mannitol, méthanol, phénol, propanol, bouillon nutritif (Difco), extrait de levure (Merck), bouillon Standard I (Merck).

Nous avons répété ces essais de croissance en conditions microaérophiles, 0.05 bar O₂, sans plus de succès.

Seule exception, le cas de MF3 sera traité ultérieurement.

Les souches islandaises, russes et japonaises présentent les mêmes "symptômes" d'une autotrophie obligatoire. Nous examinerons les causes et les effets d'un tel métabolisme dans la discussion.

14. Sulfooxydation

L'apparente incapacité de ces souches à utiliser une source de carbone organique nous a amené à considérer quelles pouvaient être les alternatives, autres qu'un développement hétérotrophe, à la croissance hydrogénotrophe.

Etant donné la nature de leur milieu, l'hypothèse la plus immédiate était celle de l'utilisation de composés réduits du soufre. Nous avons donc testé la croissance de ces souches comme sulfooxydantes.

Les principaux résultats de cette recherche ont déjà été publiés (Bonjour et Aragno 1986).

14.1. Croissance avec des composés réduits du soufre

La croissance lithoautotrophe avec des composés réduits du soufre a tout d'abord été testée en bouteilles contenant du milieu minéral de base additionné de 0.5 % de thiosulfate ou de 0.5 % de soufre. Nous avons testés la croissance des souches T3, T171, Z-829, H-1 et TK-6.

A condition que l'incubation soit faite en conditions microaérophiles (0.05 bar O_2), la croissance est significative, quoique faible, avec le soufre élémentaire, nettement positive avec le thiosulfate. Aucune croissance n'est possible si l'incubation se fait à pression partielle d'oxygène supérieure à 0.1 bar, donc notamment à l'air! Avec ces deux substrats, le pH initial d'environ 7 est abaissé et atteint des valeurs de pH de 4-5, suite à la production d'acide sulfurique. Avec le thiosulfate, on note en outre un dépôt extracellulaire de soufre

élémentaire en cours de croissance, aucune accumulation intracellulaire n'a par contre été observée.

La croissance avec l'hydrogène sulfuré n'a pas été testée pour des raisons pratiques. En effet, si l'on ajoute des sulfures sous forme de sels, il se forme du H_2S qui est rapidement éliminé à cause du gazage. La solution consistant en un apport d'hydrogène sulfuré dans la phase gazeuse a été écartée pour des raisons de sécurité.

La croissance avec des composés réduits du soufre a été confirmée pour les souches islandaises par Alfredsson et al. (1986).

14.2. Analyse de la croissance avec thiosulfate

La souche T3 a été sélectionnée pour des tests de croissance en fermenteur avec le thiosulfate comme source d'électrons et d'énergie.

Il a été nécessaire d'abaisser au maximum l'oxygénation du milieu afin de permettre la croissance. Nous avons donc débuté la croissance avec une agitation minimale, 200 rev/min, et seulement 1 % O_2 dans la phase gazeuse (N_2 : 0.85 bar / CO_2 : 0.1 bar / air: 0.05 bar). Faute de respecter ces précautions, la croissance est impossible.

Une fois la croissance initiée, l'apport d'oxygène est progressivement augmenté, soit en changeant la vitesse d'agitation, soit en augmentant le pourcentage d'oxygène dans la phase gazeuse. On aboutit finalement à une concentration de 10 % O_2 et une agitation à 800 rev/min.

Les ajustements progressifs de la concentration en oxygène sont indiqués sur la Figure 14 qui donne la courbe de croissance de la souche T3 dans ces conditions. Cette courbe n'est pas exponentielle; le taux de croissance augmente jusqu'à ce que le thiosulfate soit entièrement consommé. Durant la croissance, le

soufre élémentaire s'accumule progressivement sous forme de granules extracellulaires. Le soufre ne peut être que très difficilement quantifié, surtout parce qu'il se dépose en partie contre les parois du fermenteur. Nous avons donc tenté d'en estimer la quantité par calcul.

Pertant du principe que une mole de thiosulfate donne une mole de soufre et une mole de sulfate, nous arrivons à la formule suivante:

$$\text{Quantité de soufre} = 2x [\text{thiosulfate}] - [\text{sulfate}]$$

L'utilisation de la formule ci-dessus pré suppose que le soufre élémentaire est le seul composé s'accumulant en cours de croissance ce qui est tout à fait compatible avec les schémas du métabolisme du thiosulfate (voir discussion).

Les granules de soufre interfèrent avec toutes les mesures de la biomasse: poids sec, concentration en protéines et mesure de la densité optique; nous n'avons donc aucune quantification de la biomasse exempte de leur influence.

Les concentrations en thiosulfate et en sulfate sont mesurées respectivement par titration et par gravimétrie. L'évolution de ces concentrations est donnée dans la Figure 14.

Quand le thiosulfate est entièrement consommé, la concentration en soufre atteint 13.6 mM, soit une valeur proche de la concentration initiale en thiosulfate (16.5 mM). Elle décroît alors rapidement tandis que la croissance continue sans interruption et sans changement de pente. A la fin de la croissance, les granules de soufre ont presque disparu. La quantité résiduelle correspond au soufre collé sur les parois du fermenteur en dessus de la surface du milieu et donc inaccessible.

L'activité de l'hydrogénase est nulle pendant toute la croissance.

Il est à noter que le thiosulfate n'est pas un substrat probable dans les conditions naturelles. Il offre cependant d'importantes avantages pratiques; comme de plus nous avons démontré que son oxydation complète passe par l'oxydation du soufre, son utilisation est tout à fait justifiée.

14.3. Croissance mixolithotrophe

Comme dans les habitats étudiés l'hydrogène moléculaire et le soufre sont disponibles simultanément, nous avons décidé d'étudier la croissance de la souche T3 en présence concomitante d'hydrogène et de thiosulfate, croissance que nous qualifions de mixolithotrophe.

Nous avons travaillé dans les mêmes conditions que ci-dessus, mais en remplaçant l'azote par l'hydrogène. Il s'est avéré que, dans ces conditions, la croissance est beaucoup moins sensible à l'oxygène et peut être initiée avec la phase gazeuse suivante:
 H_2 : 0.85 bar / CO_2 : 0.1 bar / O_2 : 0.05 bar.

Les courbes de croissance ainsi que l'évolution de la concentration en thiosulfate sont données dans la Figure 15.

Dans une première phase, le thiosulfate est consommé. Conjointement, les cellules possèdent une activité hydrogénasique de 1.71 U/mg, soit une valeur comparable à celle des cellules cultivées uniquement avec de l'hydrogène comme source d'énergie et d'électron (1.85 U/mg). Dans cette première phase, le taux de croissance est de: $\mu_{max} = 0.67$

Après épuisement du thiosulfate, la croissance s'infléchit et le taux de croissance ne vaut plus que: $\mu_{max} = 0.3$, valeur similaire à celle obtenue avec des cellules cultivées dès le début avec de l'hydrogène uniquement.

Les résultats des points 14.2 et 14.3 sont résumés dans le Tableau 18 et seront reprises dans la discussion.

14.4. Applications de la mixolithotrophie

Cultivées en conditions mixolithotropes, les bactéries étudiées sont capables de pousser sur milieu solide (voir point 8), chose impossible en conditions H_2 -lithotropes.

Cette particularité pourrait être liée au taux de croissance plus élevé ou peut-être à une sensibilité diminuée à l'oxygène.

Ce mode de croissance nous a été très utile pour faire "redémarrer" d'anciennes cultures.

Il paraît évident que dans ces conditions, les bactéries sont beaucoup plus à l'aise, preuve en est leur plus grand taux de croissance et leur plus grand pouvoir de récupération.

La mise en valeur de cette propriété lors d'enrichissements sera discutée dans le chapitre VII.

15. Caractérisation enzymatique

Nous nous sommes attachés plus spécialement aux enzymes de l'autotrophie, soit pour les hydrogénobactéries: l'hydrogénase et le RUBP carboxylase. Après avoir mis en évidence les particularités métaboliques de ces bactéries, nous avons également dosé la phosphoribulokinase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase.

15.1. Activité de l'hydrogénase

Les valeurs mesurées pour l'activité de l'hydrogénase sont très variables et dépendant de l'état physiologique de la cellule. Le Tableau 19 donne quelques-unes des valeurs mesurées à 50°C sur des cellules entières. Sur des cellules cessées ou à plus haute température, cette activité est plus élevée.

15.1.1. Activité en fonction de la température

La relation entre l'activité de l'hydrogénase et la température est donnée pour les souches MF3 et P10 (Fig.16).

Dans les deux cas, l'optimum est supérieur à 70°C. Nous n'avons pas pu tester l'activité à 80°C car, en dessous de 76°C, la catalase présente dans le mélange réactionnel précipite, empêchant toute mesure. Il est d'ailleurs remarquable de constater que cette catalase, enzyme extraite d'un organisme mésophile, reste fonctionnelle jusqu'à 70°C!

La loi d'Arrhénius voudrait que l'activité enzymatique double tous les dix degrés; dans les deux exemples donnés ici, la pente est plus faible, elle ne double que tous les 20°C environ. On a peut-être là un exemple d'une activité catalytique réduite aux dépens d'une meilleure thermostabilité.

Kryukov et al. (1983) ont montré que l'hydrogénase de la souche Z-829 perdait son activité après vingt minutes de chauffage à 93°C et que son optimum se situait entre 70 et 80°C; cet optimum était différent selon la souche étudiée et pouvait atteindre 90°C.

15.1.2. Localisation

L'hydrogène peut être activé par deux types d'hydrogénase. L'une est soluble -cytoplasmique - et transfère les électrons provenant de l'hydrogène directement au NAD⁺; l'autre est liée à la membrane et transmet les électrons directement dans la chaîne respiratoire, mais à un potentiel plus élevé que celui du couple NAD⁺/NADH + H⁺ qui ne peut donc pas être directement réduit. La majorité des hydrogénobactéries décrites ne possèdent que cette hydrogénase membranaire, seule Nocardia opaca et Alcaligenes eutrophus possèdent une hydrogénase soluble, la dernière cumulant les deux types (Aragno et Schlegel 1981).

Dans un premier test, nous avons mesuré la réduction du NAD⁺ par des extraits cellulaires; cette réduction est à priori la signature de l'activité de l'hydrogénase soluble. Cette activité n'a pas pu être mise en évidence chez les souches étudiées, nous avons donc postulé qu'elles ne possédaient qu'une hydrogénase membranaire. Des mesures de l'activité de l'hydrogénase dans les fractions solubles et membranaires ont confirmé cette assertion. Les résultats sont donnés dans le Tableau 20.

15.2. Activité de la RUBP carboxylase

Enzyme typique du cycle de Calvin, la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase (RUBP carboxylase) est, chez les organismes aérobies, la protéine de fixation du CO₂ universelle...ou presque. Travaillant avec des autotrophes, c'est donc tout naturellement son activité que nous avons cherché à mettre en évidence... sans aucun succès!

Dès les premiers essais avec la souche MF3, nous avons constaté qu'il y avait un problème, soit de méthodologie, soit de métabolisme! Afin de s'assurer que l'absence totale d'activité de la RUBP carboxylase était bien réelle, nous avons pris soin de répéter l'expérience dans les conditions suivantes:

- Expérience à 30°C avec comme témoin positif, Aquaspirillum autotrophicum (ATCC 29984)
- Expérience à 50°C avec comme témoin positif la souche O61 isolée de Naples (cette souche, autotrophe facultative, a été perdue par la suite).
- Expérience avec des cellules cassées à la "French Press" afin de s'assurer que l'absence d'activité n'était pas liée à une insensibilité des cellules à l'action perméabilisante du toluène.

Quelles que soient les conditions choisies, aucune activité n'a pu être décelée chez ces bactéries.

15.3. Activité de la phosphoribulokinase

Le concept fixation du CO_2 ---> Cycle de Calvin, chez les bactéries aérobies, étant fermement ancré dans les esprits, il nous a paru indispensable de tester l'activité d'une autre enzyme clé de ce cycle afin d'éclaircir au mieux la situation. Nous avons naturellement choisi de mettre en évidence l'activité de la phosphoribulokinase (PRK).

Les activités de la PRK sont données dans le Tableau 21. Aucune des souches ne présentant d'activité significative, l'absence d'un cycle de Calvin s'impose et avec elle, la nécessité d'élucider la voie de fixation du CO_2 chez ces souches. Ce point sera traité dans la discussion.

15.4. Activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase

Aucune des souches d'Hydrogenobacter testée ne présente d'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase, enzyme clé du cycle de Krebs et conséquemment de la croissance hétérotrophe. Ceci confirme les travaux de Shiba et al. (1982).

La souche MF3, autotrophe facultative (voir ci-dessous) ne présente pas non plus d'activité, que cela soit sur des cellules cultivées en conditions autotrophes ou hétérotrophes (butyrate). Nous reprendrons ce point dans la discussion.

16. La souche MF3

Nous avons jusqu'ici plus ou moins passé sous silence les particularités de cette souche. Isolée de l'Etna, cette souche a pu être purifiée par étalement sur agar, contrairement à tous les

autres Hydrogenobacter qui ne peuvent pousser sur milieu solide que dans certaines conditions (voir point 8). Après purification cependant, la croissance sur milieu solide n'a plus été possible qu'en conditions mixotrophes: 0.2 % glucose et hydrogène.

Plus étonnante est la propriété qu'a cette souche de se développer en conditions hétérotrophes alors même qu'elle présente 100 % d'homologie avec des souches obligatoirement autotrophes.

La liste des substrats carbonés métabolisables a considérablement varié au cours des premiers essais, s'élargissant constamment; en même temps, la croissance H₂-lithotrophe, initialement irrégulière, s'est peu à peu stabilisée. Visiblement la souche s'est adaptée à la culture en laboratoire.

Les substances permettant la croissance de la souche MF3 en conditions hétérotrophes sont: D(+) cellobiose, D(+) fructose, D(+) glucose, D(+) maltose, D(+) mannose, D(+) saccharose, acétate, butyrate, o-cétogutarate, D gluconate, malate, oxaloacétate, pyruvate, succinate, D(+) L(-) tartrates, DL-alanine, D et L-aspartates, D-glutamate, L-phénylalanine, L-proline, éthanol, glycérol, extrait de levure (Difco) et bouillon nutritif Standard I (Merck).

Aucune des autres substances mentionnées au point 13 n'est métabolisée (voir aussi Tableau 22).

Cette autotrophie facultative étant l'unique point distinguant MF3 de toutes les autres souches d'Hydrogenobacter, notre premier soin a donc été de vérifier la pureté de la souche étudiée. Les preuves de la pureté de la souche MF3 sont:

- Aspect homogène des colonies obtenues par culture en conditions mixotrophes (glucose et hydrogène) et mixolithotrophes (thiosulfate et hydrogène).
- Aspect homogène lors d'observations au microscope.

- Absence d'un deuxième point d'inflexion dans la courbe de dénaturation de l'ADN.
- Identité des pourcentages G + C des cellules cultivées en conditions hétérotrophes (38.9) ou eutotrophes (38.6).

Nous estimons ces preuves suffisantes pour assurer que la souche MF3 est une souche pure. Nous reprendrons son cas dans la discussion.

B) DISCUSSION

1. L'autotrophie obligatoire

" From ecological and evolutionary considerations, an absolute dependance on carbon dioxide for all carbon makes little sense, and bacteria with such a requirement would be an anachronism on earth as it now exists".

Rittenberg (1972)

"...we have pointed out the selective advantage that may be conferred on such organisms living in natural environments in potential competition with heterotrophs; consequently we would say that natural selection answers the question "why obligate" ".

Whittenbury et Kelly (1977)

A cinq ans d'intervalle et alors que les données disponibles n'ont pu amener à un tel revirement d'opinion, de semblables divergences laissent entrevoir la complexité du problème...et permettent de nuancer le crédo de l'objectivité scientifique! Il convient donc d'aborder ce sujet avec beaucoup de circonspection et de bien baliser notre raisonnement.

1.1. Définition

La formulation du concept de lithoautotrophie a été énoncée par Winogradsky (1887, 1888) lors de l'étude des bactéries sulfo et ferroxydantes. En 1922, il définit le nouveau type de métabolisme découvert qu'il appelle "Anorgoxydation". Il s'agit d'un métabolisme où l'oxydation de substances inorganiques fournit l'énergie et où la source de carbone est le gaz carbonique. Ce terme n'a pas passé à la postérité et on parle plutôt aujourd'hui de bactéries chimolithoautotrophes.

D'après la définition de Schlegel (1975), les microorganismes chimioolithoautotrophes aérobies tirent leur énergie de l'oxydation de composés inorganiques tels que les formes réduites ou partiellement oxydées du soufre et de l'azote, l'ion ferreux et l'hydrogène. L'accepteur d'électrons est généralement l'oxygène, mais il peut éventuellement être remplacé par des composés azotés (nitrite, nitrate). Le dioxyde de carbone peut servir d'unique source de carbone.

Les conséquences d'un tel métabolisme ont été résumées comme suit (Schlegel 1975):

- Grande consommation du donneur primaire d'électrons comparativement au rendement cellulaire (par rapport à l'hétérotrophie).
- Demande d'oxygène, en fonction du taux de croissance, élevée (par rapport à l'hétérotrophie).
- Caractère non indispensable des voies cataboliques et du cycle tricarboxylique dont seule les enzymes participent à des voies biosynthétiques doivent être présentes.
- Existence de mécanismes de régulation garantissant une répartition harmonieuse de l'énergie dans la cellule et protégeant les réactions endergoniques de biosynthèse d'une canalisation exclusive de l'ATP pour la fixation du CO_2 .
- Présence fréquente de systèmes de membranes intracellulaires.

Un consensus s'est établi autour de cette définition de Schlegel que nous prendrons donc comme base à notre discussion.

La situation est moins claire en ce qui concerne le terme d'autotrophe obligatoire. Pour Martin (1978), les bactéries incapables de pousser dans un milieu organique sont désignées comme autotrophes obligatoires. Schlegel (1975) part du même principe qu'il précise: une bactérie lithoautotrophe obligatoire

ne peut pas se développer dans un milieu contenant uniquement des composés organiques comme source de carbone et d'énergie, ce qui ne signifie pas que des composés organiques ne puissent être incorporés dans la substance cellulaire. Rittenberg (1972) conteste la notion même d'autotrophie obligatoire. Pour lui, dans des conditions adéquates, le carbone organique peut être assimilé et remplacer le CO_2 . Il existerait donc des lithotrophes obligatoires mais pas des autotrophes obligatoires.

1.2. Causes de l'autotrophie obligatoire

Avant de prendre position, voyons quelles sont les raisons qui peuvent, en théorie, mener à une stricte dépendance pour une source de carbone inorganique.

a) Imperméabilité.

Une absence totale de mécanismes d'entrées des composés organiques expliquerait la non croissance en conditions hétérotrophes. Des essais réalisés avec des traceurs radioisotopiques montrent que cette hypothèse est incorrecte. L'incorporation d'un ou plusieurs composés de la série: aspartate, acétate, glutamate, glutamine, sérine, glucose a été démontrée chez Nitrosomonas europaea (Clark et Schmidt 1967); Thiobacillus neapolitanus (Kelly 1966, 1967); Nitrobacter agilis (Delwiche et Finstein 1965, Smith et Hoare 1968); Thiobacillus thiooxydans (Butler et Umbreit 1966); Thiobacillus thioparvus et T. neapolitanus (Johnson et Abraham 1969) etc.

Dans tous les cas, le taux d'incorporation du carbone organique est plus ou moins dépendant de la disponibilité concomitante du donneur d'électrons et donc d'une source d'énergie.

C'est en se basant sur de telles expériences d'assimilation que Rittenberg (1972) invalide le terme d'autotrophe obligatoire. La proportion de carbone assimilé excède pourtant rarement 10 % (Smith et al. 1967, Martin 1978) et la dépendance de ces bactéries pour une source de carbone inorganique reste donc certaine.

Le fait que des composées carbonées puissent servir de source de carbone inorganique - quoique très partiellement - mais ne peuvent pas remplacer la source inorganique d'énergie amène à formuler une deuxième hypothèse:

b) Equipement enzymatique déficient

Smith et al. (1967) ont pu démontrer, chez de nombreux autotrophes obligatoires, l'absence d' α -cétoglutarate déshydrogénase et/ou l'impossibilité d'utiliser le NADH comme donneur d'électrons dans la chaîne respiratoire. Ce dernier point pourrait se justifier par le fait qu'une grande partie du NADH est formé par une "remontée" obligatoire de la chaîne respiratoire avec dépense notable d'énergie.

La possibilité d'une telle oxydation dans des extraits cellulaires de lithotrophes obligatoires a cependant pu être démontrée (Martin 1978), on sait par ailleurs que chez les autotrophes facultatifs, la chaîne respiratoire fonctionne dans les deux sens.

L'absence d' α -cétoglutarate déshydrogénase annulerait le rôle catabolique du cycle de Kreb tout en lui conservant son potentiel biosynthétique. On n'a pas détecté d'activité d' α -cétoglutarate déshydrogénase chez de nombreux autotrophes obligatoires: Thiobacillus thiooxydans, T. thioparus, T. neapolitanus, Nitrosolobus multiformis... (Whittenbury et Kelly 1977). Une telle absence ne suffit toutefois pas à elle seule à impliquer une autotrophie obligatoire, des mécanismes alternatifs comme un cycle glyoxylate pouvant y pallier - cette combinaison métabolique a été rapportée chez un Chromatium (Trüper 1964) et postulée chez un Thiobacillus thermophile (Williams et Hoare 1972). De plus, il convient de se souvenir que chez plusieurs autotrophes facultatifs, cette enzyme est inductible et n'apparaît qu'après culture en conditions hétérotrophes. Il faudrait donc cerner l'absence d'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase autrement que par des tests d'activité effectués (et pour cause!) sur des cultures autotrophes, p.ex. en utilisant des sondes moléculaires.

Il est probable malgré tout que l'absence de cette enzyme puisse ponctuellement expliquer l'autotrophie obligatoire, mais il ne s'agit pas là d'un mécanisme universel.

c) Inhibition par un substrat organique, autoinhibition.

De nombreuses substances organiques inhibent la croissance des autotrophes obligatoires dans un domaine de concentration de 10^{-4} à 10^{-3} M. (cette situation se trouve d'ailleurs chez d'autres groupes de bactéries). Une telle sensibilité exclut une imperméabilité totale aux substances organiques mais suggère que l'utilisation de ces composés va produire des dérivés toxiques qui vont rapidement stopper la croissance, d'où le terme d'autoinhibition. L'utilisation du glucose par Thiobacillus thiooxidans produit par exemple, dans le milieu, des cétoacides toxiques (pyruvate, oxaloacétate) qui stoppent la croissance. En éliminant ces cétoacides par dialyse, Borichewsky et Umbreit (1966) rapportent qu'ils ont réussi à cultiver cette bactérie en conditions hétérotrophes. Utilisant ce même artifice, Pan et Umbreit (1972) ont également réussi à cultiver d'autres autotrophes obligatoires comme T. thioparvus, T. neapolitanus, Nitrosomonas europaea... en conditions hétérotrophes.

Bien que ces résultats aient été critiqués (Matin 1978), ils ont le mérite de suggérer une nouvelle hypothèse: comme l'excrétion de métabolites est souvent le résultat d'un métabolisme non équilibré ou de mécanismes de contrôles defectueux, les observations faites en cultures dialysées pourraient être indicatives d'un défaut de régulation.

Il est concevable qu'une combinaison de mécanismes de transport inefficaces et de faibles activités enzymatiques empêche une vitesse d'utilisation des composés organiques suffisamment rapide pour satisfaire les besoins énergétiques et biosynthétiques majeurs. L'énergie obtenue à partir de substrats organiques ne permet pas d'assurer le flux minimal d'énergie nécessaire à l'entretien de la cellule. Les composés organiques peuvent tout au plus servir de source de carbone mais pas d'énergie. Cela

signifie que si un développement hétérotrophe n'est pas possible, une croissance mixotrophe n'est cependant pas exclue.

1.3. Aspects écologiques

Smith et Hoare (1968) proposaient de remplacer le terme d'autotrophe obligatoire par celui de spécialiste qui, quoique moins précis, a le mérite d'être très parlant sur le plan écologique.

La présence de ces organismes dans un monde microbien où la versatilité est généralement considérée comme une des clés de la réussite peut paraître paradoxale, d'où peut-être l'assertion de Rittenberg (1972) qui estime très improbable un tel mécanisme.

"considering... the nature of the environment it seems unlikely that an organism living in the midst of organic molecules would ignore these molecules and make them de novo from carbon dioxide".

Si on ajoute que pour convertir en matériel cellulaire une mole de carbone provenant d'un hydrate de carbone il faut 2.9 mole d'ATP contre 7.9 si le carbone provient du CO_2 (Hempfling et Vishniac 1967), on aurait tendance à abonder dans ce sens ou du moins à imaginer que les autotrophes obligatoires ne peuvent se trouver que dans les rares milieux fortement limités en matière organique mais riches en énergie.

Il est cependant certain que la distribution des autotrophes obligatoires ne se résume pas aux milieux dépourvus de carbone organique et, même si on peut alléguer l'existence de microenvironnements, il faut considérer que les autotrophes obligatoires sont à même de soutenir la compétition avec des microorganismes versatiles (Beudecker et al. 1982, Kuenen et Gottschal 1982, Kuenen et Robertson 1984).

Pour Whittenbury et Kelly (1977) l'autotrophe a deux choix pour assurer sa survie: ou bien il est autotrophe obligatoire et dans ce cas il n'entre pas en compétition avec les hétérotrophes pour l'acquisition de carbone organique; ou alors il est capable de rivaliser avec les hétérotrophes quand il abandonne son mode de vie autotrophe avec de façon concomitante une répression des enzymes de l'autotrophie. Ce raisonnement laisse malheureusement de côté le problème épineux de la mixotrophie qui au niveau écologique apparaît d'une importance primordiale.

Une clé est peut-être fournie par les expériences de Kuenen et Robertseon (1984) que l'on peut résumer comme suit. Soit trois bactéries:

- Thiobacillus neapolitanus autotrophe strict, spécialiste
- Spirillum G7 hétérotrophe, spécialiste
- T.versutus A2 autotrophe facultatif, versatile

Les devenir de la compétition sont les suivantes:

Quand le substrat n'est pas limitant ou qu'il est fourni en permanence, la souche mixotrophe est éliminée car le spécialiste, sur son substrat spécifique, un taux de croissance plus élevé.

Quand des concentrations limitantes d'un mélange des deux substrats sont disponibles, la souche mixotrophe domine à condition que les disponibilités en composées organiques et inorganiques soient du même ordre de magnitude, mais si un des substrats est en excès, le spécialiste est favorisé.

La coexistence de toutes les espèces est possible et dépend du rapport entre sources d'énergie organique et inorganique.

Quand les concentrations en substrats fluctuent au cours du temps, l'évolution de la compétition dépend de la composition des apports alternatifs; dans ce cas là, le succès du spécialiste réside dans sa plus grande réactivité (Beudecker et al. 1982) et

ce n'est que dans des conditions favorables à une croissance mixotrophe que le spécialiste peut être dominé.

Il ressort de cette expérience que le spécialiste n'est pas si handicapé que cela sur le plan écologique. En fait, les bactéries autotrophes obligatoires sont des ouvriers spécialisés, ils coûtent cher, mais dans certains cas, leur engagement est préférable à celui d'hommes à tout faire!

1.4. Le cas des Hydrogenobacter

La dernière monographie parue sur les hydrogénobactéries (Aragno et Schlegel 1981) posait comme un fait bien établi l'absence d'autotrophes obligatoires dans ce groupe.

Les travaux effectués sur le genre Hydrogenobacter nous amenant à réviser ce jugement; comme tous les autres groupes de bactéries lithoautotrophes, les hydrogénobactéries ont leurs spécialistes.

Les évidences d'une autotrophie obligatoire chez les Hydrogenobacter sont les suivantes:

- Pas de croissance en conditions hétérotrophes.
- Absence des enzymes clés du métabolisme des hydrates de carbone: pyruvate kinase, 6-phosphogluconate déshydrogase, 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase (Shiba et al. 1982).
- Absence d' α -cétoglutarate déshydrogénase.

Shiba et al. (1984) ont en outre démontré que la plupart des composés organiques n'étaient que très faiblement oxydés par des extraits cellulaires et ne pouvaient être incorporés qu'en présence d'une source d'énergie, en l'occurrence l'hydrogène.

Nous retrouvons donc les caractéristiques communes aux autotrophes obligatoires: assimilation limitée et conditionnelle

de substances organiques lesquelles ne sont que très faiblement oxydées; croissance hétérotrophe impossible; équipement enzymatique déficient.

Il est toujours difficile de prouver l'absence d'un métabolisme et si toutes les caractéristiques énumérées ci-dessus constituent des preuves nécessaires, elles ne suffisent pas à démontrer de manière absolue l'incapacité totale des Hydrogenobacter à métaboliser des composés organiques. Il faut se souvenir que toutes les activités sus-mentionnées ont été testées en conditions autotrophes et donc que les résultats obtenus peuvent tout aussi bien prouver leur caractère inductible que leur inexistence. De même, il faudrait répéter les essais de croissance hétérotrophe dans de nombreuses conditions avant de pouvoir certifier que celle-ci est impossible (pression en oxygène réduite, présence concomitante de composés réduits du soufre ou d'hydrogène, etc.). Ce qui nous incite à une prudence excessive dans le cas des Hydrogenobacter est l'existence d'une souche visiblement incluse dans ce groupe, mais capable de se développer en conditions hétérotrophes (voir chapitre VA, point 16).

Ces réserves émises, nous pouvons cependant, au vu des résultats acquis à ce jour, considérer les Hydrogenobacter comme les seules hydrogénobactéries lithoautotrophes obligatoires isolées à ce jour.

1.5. Le cas de MF3, souche facultativement autotrophe

En 1982, Savel'eva et al. ont décrit une hydrogénobactérie autotrophe facultative ayant un pourcentage G + C de 41 % et un optimum de température de 76°C. Cette souche, Z-809, a ensuite été considérée comme contaminée et écartée (Zavarzin, communication personnelle). Les recherches se sont alors focalisées sur la description de souches voisines, autotrophes obligatoires, ce qui devait permettre d'aboutir à la description du genre Caldobacterium (Kryukov et al. 1983).

Les preuves de la contamination de la souche Z-809 ne sont pas claires et on ne peut que regretter la disparition d'une souche qu'il aurait été si intéressant de comparer avec MF3.

En nous basant sur les données de la littérature (Savel'eva et al. 1982), nous avons établi un tableau comparatif de ces deux souches (Tableau 22). Il ressort de ces données que la seule différence importante entre ces souches est l'utilisation des sucres par MF3 alors que Z-809 en semble incapable. A notre avis, le poids de cette différence doit être relativisé. En effet, lors des premiers essais, MF3 était elle aussi incapable de métaboliser les sucres. Nous avons ensuite mis en évidence que cela était néanmoins possible, à condition de travailler en conditions microaérophiles. Ce n'est qu'après plus d'une année d'expérimentation que la croissance avec des sucres, en conditions aérobies, s'est révélée positive. Il est d'ailleurs fréquent que les souches cultivées présentent initialement de telles variations, la stabilisation des propriétés se faisant une fois que la bactérie s'est adaptée de façon optimale à la culture en laboratoire.

Nous ignorons si de telles répétitions des essais de croissance en conditions hétérotrophes ont été effectués avec la souche Z-809.

Les autres différences sont de moindre importance, surtout si l'on songe que les expériences ont été réalisées dans des conditions dissemblables.

L'existence de la souche Z-809, même si sa position taxonomique exacte n'a pu être établie, tendrait à confirmer que l'on trouve des bactéries facultativement autotrophes à l'intérieur d'un groupe d'autotrophes obligatoires. Deux questions s'imposent alors:

- Où réside la différence?

- Pourquoi isole-t-on si rarement des Hydrogenobacter autotrophes facultatifs?

Nous avons vu précédemment les différentes causes possibles de l'autotrophie obligatoire; il s'agit maintenant de faire un raisonnement inverse et de chercher quels sont les changements minimaux requis pour abolir cette incapacité à métaboliser des composés organiques. Nous avons évoqué trois causes principales à l'autotrophie obligatoire: l'absence de perméases, l'absence d' α -cétoglutarate déshydrogénase et des défauts de régulation avec, en corrélation, des problèmes d'autoinhibition. Examinons maintenant les possibilités de réversion spécifiques à chaque cas.

- MF3 pourrait posséder des perméases manquant aux autres Hydrogenobacter. Outre le fait que l'absence de perméases constitue une mauvaise explication de l'autotrophie obligatoire, il faudrait postuler que, vu le large éventail de composés organiques métabolisables (Tableau 22), MF3 possède plusieurs enzymes supplémentaires relativement aux autres souches du même groupe. Nous allons là à l'encontre du changement minimal requis.
- MF3 posséderait une α -cétoglutarate déshydrogénase. L'absence d'une activité α -cétoglutarate déshydrogénase a été établie chez les Hydrogenobacter cultivées en conditions autotrophes. Nous ne pouvons donc pas exclure que les gènes codant pour cette enzyme soient présents, mais que celle-ci ne puisse être induite dans les conditions de culture choisies, que cela soit en conditions autotrophes (pas d'activité) ou hétérotrophes (pas de croissance). On peut supposer une répression de l' α -cétoglutarate déshydrogénase liée au milieu (absence d'un cofacteur, concentration critique d'un composant, répression par l'hydrogène) ou aux conditions d'incubation (température, pression partielle en oxygène). Il suffit alors de postuler que la souche MF3 possède un système de régulation légèrement différent, soit dans son mécanisme, soit dans sa sensibilité pour expliquer son autotrophie facultative.

Il est évident qu'un tel schéma hautement spéculatif demande à des confirmations expérimentales, à commencer par la mise en évidence de l'activité de cette enzyme chez des cellules de MF3 cultivées en conditions hétérotrophes.

C'est ce que nous avons tenté de faire en mesurant l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase sur des cellules cultivées d'une part en conditions autotrophes, d'autre part en conditions hétérotrophes avec le butyrate comme source de carbone. Dans les conditions expérimentales choisies, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence cette activité enzymatique. Nous pensons néanmoins que ce test devrait être répété dans d'autres conditions avant de se prononcer définitivement sur ce point.

- MF3 posséderait un système de régulation différent.
- Nous rejoignons là l'hypothèse ci-dessus en l'appliquant éventuellement à d'autres enzymes.

La seconde question soulève un problème plus délicat. Il ressort clairement des différents travaux sur le genre Hydrogenobacter que l'on isole rarement des autotrophes facultatifs appartenant à ce groupe. Il conviendrait donc de chercher des conditions d'isolement qui privilégieraient les autotrophes facultatifs. On peut p.ex. imaginer un enrichissement se faisant - au moins partiellement - en conditions hétérotrophes. Il est peut-être également possible de jouer sur une autre caractéristique des autotrophes facultatifs: leur tolérance accrue à l'oxygène. En effet, les souches Z-809 et MF3 sont les seules à avoir pu être purifiées par étalement sur milieu solide. Il est loisible de supposer que les souches qui, pour une raison ou pour une autre (écologie, régulation...), sont moins sensibles à la pression partielle en oxygène sont à même de se développer sur milieu solide (quelles que soient les conditions de culture, voir ce chapitre, point 4 et chapitre VA, point 8). Il semble que ces mêmes souches sont celles capables d'un développement hétérotrophe.

Il conviendrait donc de faire des recherches plus systématiques dans des milieux où la concentration en oxygène est plus élevée que celle mesurée dans les milieux habituellement investigués, p.ex. température inférieure, aération optimale etc. Pour affiner, les enrichissements devraient être effectués alternativement en conditions auto et hétérotrophes.

Remarquons que MF3 a été isolée d'un milieu beaucoup plus riche en oxygène que les autres Hydrogenobacter puisque obtenue à partir de cendres volcaniques parcourues par des fumerolles.

D'autres possibilités peuvent certainement être évoquées, mais nous devons en tous cas écarter celle d'une pression sélective visant à l'utilisation des substances carbonées présentes dans le milieu puisque le sol d'où a été isolé MF3 ne contenait que 0.025 % de matière organique!

1.6. Existence d'autres hydrogénobactéries autotrophes obligatoires

Comme nous l'avons déjà souligné à plusieurs reprises, les Hydrogenobacter sont les seules hydrogénobactéries autotrophes obligatoires isolées à ce jour. Ce sont aussi les seules hydrogénobactéries non sporulantes valablement décrites isolées de milieux géothermaux. Y a-t-il là une relation de cause à effet et si oui, de quelle nature?

Les trois paramètres les plus importants caractérisant les milieux géothermaux sont: l'abondance en hydrogène, la faible teneur en matière organique et les hautes températures. De quelle manière ces facteurs peuvent-ils contribuer à l'isolement d'autotrophes obligatoires?

- Abondance en hydrogène.

Dans la plupart des milieux naturels, l'hydrogène n'est présent qu'en concentration très faible et intermittente, il paraît utopique de chercher dans de tels milieux des bactéries dont la

survie serait obligatoirement liée à la présence préalable d'un tel composé. Dans les milieux géothermiques au contraire, l'hydrogène est un composant permanent et relativement abondant. Dans de telles conditions, une lithotrophie obligatoire basée sur l'hydrogène est plausible voire probable.

Si l'on reconsidère l'expérience de compétition, déjà décrite, réalisée par Kuenen et Robertson (1984) entre: un autotrophe obligatoire, un mixotrophe et un hétérotrophe obligatoire, on comprend mieux pourquoi aucun des isollements réalisés jusque là n'avait permis l'isolement d'un spécialiste. Le maintien de celui-ci implique en effet un apport minimal de son substrat de prédilection (point 1.3), apport qui est loin d'être effectif dans les milieux généralement étudiés. Il nous semble donc que l'apport régulier d'hydrogène dans les milieux géothermiques constitue une des clés de l'isolement d' H_2 -lithotrophes obligatoires.

- Pauvreté en matière organique

Il paraît peu vraisemblable d'isoler des autotrophes obligatoires de milieux où le carbone organique est abondant. Il n'est cependant pas nécessaire que la matière organique soit totalement absente pour que des lithotrophes obligatoires soient compétitifs. Kuenen et Robertson (1984) ont montré que si la concentration en substrat inorganique excède largement celle du substrat organique, un autotrophe obligatoire peut fort bien se maintenir. C'est également le cas si la matière organique n'est présente que de façon transitoire.

- Hautes températures

Il ne semble pas y avoir a priori de relation entre la température et l'autotrophie obligatoire; cependant, il faut peut-être considérer le problème sous un angle évolutif.

Si l'on envisage que la vie est apparue dans un environnement à haute température (voir chapitre II), alors les environnements géothermiques constituent des milieux privilégiés perpétuant des conditions existant depuis fort longtemps. On pourrait donc

trouver dans ces milieux des organismes ayant conservé des caractères phénotypiques primitifs, survivant dans ces niches-là, mais incapables de se maintenir dans des milieux où la compétition est plus ouverte. La question de savoir si l'autotrophie obligatoire constitue un caractère primitif reste ouverte.

Nous reparlerons de l'aspect évolutif de l'autotrophie obligatoire sous le point 5. de ce chapitre.

Nous avons donc vu que si l'on veut isoler d'autres hydrogénobactéries obligatoirement autotrophes, il faut les chercher dans des milieux riches en hydrogène, mais peut-être aussi dans des milieux présentant des conditions extrêmes - pas nécessairement des températures élevées - permettant aux bactéries ayant ce type de métabolisme de se développer à l'abri des pressions de sélection.

2. La fixation du CO₂

Plusieurs genres de bactéries, ainsi que les plantes vertes, sont capables de se développer autotrophiquement en fixant le CO₂ par le cycle de Calvin. La présence de ce cycle, appelé aussi cycle réductif des pentoses phosphates, chez tous les autotrophes initialement testés laissait supposer qu'il s'agissait là d'un mécanisme universel. La capacité à fixer le CO₂ paraissait être apparue une seule fois au cours de l'évolution et selon un mécanisme unique.

La découverte de nouvelles bactéries, l'investigation plus systématique des voies de fixation du CO₂ ont amené à réviser cette idée. On connaît bien maintenant au moins deux autres voies de fixation: la voie de l'acétyl CoA et le cycle réductif de l'acide citrique.

2.1. Les trois voies de fixation du CO₂

Rappelons tout d'abord rapidement le principe du cycle le plus connu, le cycle de Calvin.

2.1.1. Le cycle de Calvin

Ce cycle peut schématiquement se décomposer en trois phases:

- Fixation du CO₂

La fixation du CO₂ sur un ribulose biphosphate donne deux acides phosphoglycériques; cette étape est catalysée par la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase, enzyme clé de cette voie métabolique.

- Réduction

L'acide phosphoglycérique va être réduit en glycéraldéhyde-3-phosphate, le CO₂ est ainsi ramené au niveau d'oxydation des principaux constituants cellulaires.

- Régénération de l'accepteur

Empruntant les réactions de la néoglucogénèse et, à quelques nuances près, celles de la voie des pentoses phosphates, les molécules de glycéraldéhyde 3P vont être converties en ribulose 5P qui sera phosphorylé en ribulose 1,5 biphosphate par la seconde enzyme typique du cycle, la phosphoribulokinase.

La mise en évidence du cycle passe par la mesure de l'activité de ces deux enzymes clés.

2.1.2. La voie de l'acétyl CoA

La voie la plus directe concevable permettant de fixer le CO₂ consiste à lier deux molécules de carbone ensemble pour obtenir un composé en C₂ puis de polymériser ces composés ou d'y ajouter séquentiellement de nouvelles unités en C₁. Un tel mécanisme

existe, il implique la réduction d'un CO_2 en un groupe méthyle puis sa combinaison avec une seconde molécule de CO_2 et un coenzyme A pour former un acétyl CoA. L'acétyl CoA est carboxylé en pyruvate puis en oxaloacétate qui emprunte le cycle de Krebs à "l'envers" jusqu'au stade de l' α -cétoglutarate.

Wood et al. (1986a) ont proposé de nommer ce processus voie de l'acétyl CoA, notons qu'il ne s'agit pas d'un cycle!

L'enzyme clé de cette voie est une monooxyde de carbone déshydrogénase. Cette enzyme catalyse la réduction réversible du CO_2 en CO qui forme le groupement carbonyle de l'acétate. En combinaison avec d'autres enzymes, elle catalyse aussi l'addition des groupes méthyle et carbonyle pour former un résidu acétyl activé qui formera ultérieurement un acétyl CoA.

Il conviendrait de nommer cette enzyme différemment pour la différencier de son homonyme présente dans les organismes aérobies et qui sert à convertir le CO en CO_2 . Wood et al. (1986b) ont proposé le terme d'acétyl CoA synthase.

Cette voie permet la fixation du CO_2 chez les bactéries acétogènes et méthanogènes ainsi que chez la plupart des sulfatoréductrices. Holo et Sirsvag (1986) ont récemment présenté des évidences suggérant que Chloroflexus aurantiacus utiliserait également cette voie.

Une variante de cette voie est utilisée par un sous-groupe de bactéries acétogènes, il s'agit de la voie glycine synthase / glycine réductase qui implique la condensation de deux unités C_1 en glycine, réduite ensuite en acétate (Fuchs 1986).

Outre la possibilité de fixation autotrophe du CO_2 , cette voie remplit encore de nombreux rôles comme p.ex.: synthèse d'acétate chez les acétogènes, partition de l'acétate en CO_2 et H_2 dans le métabolisme énergétique des bactéries méthanogènes (Fuchs 1986).

2.1.3. Cycle réductif de l'acide citrique

Une deuxième alternative au cycle de Calvin a été récemment décrite chez les Chlorobiaceae.

Ce cycle décrit en détail chez Chlorobium limicola (Evans et al. 1966, Fuchs et al. 1980a,b) comporte quatre étapes de fixation du CO₂ permettant la carboxylation de: l'acétyl CoA en pyruvate; du phosphoenolpyruvate en oxaloacétate; du succinyl CoA en o-cétoglutarate et de l'o-cétoglutarate en citrate.

Les deux enzymes typiques de ce cycle (appelé aussi cycle tricarboxylique inversé) sont: l'o-cétoglutarate synthase, catalysant la carboxylation du succinyl CoA, et une ATP citrate lyase scindant le citrate en acétyl CoA et oxaloacétate. Une variante de ce cycle a également été décrite chez Sulfolobus brierleyi¹ (Kandler et Stetter 1981).

Chez Desulfobacter hydrogenophilus, anaérobe strict, capable de se développer avec CO₂, H₂ et sulfate comme seules sources de carbone et d'énergie, le CO₂ est également fixé par un cycle citrique réductif (Schauder et al. 1987). D'autres sulfatoreducteurs comme Desulfovibrio baarsii fixent par contre le CO₂ par la voie de l'acétyl CoA (Jansen et al. 1984, 1985).

La comparaison du bilan énergétique de ces trois modes de fixation montre que le cycle de Calvin est le plus exigeant en énergie: 9 ATP / CO₂ fixé alors qu'il faut 5 ATP pour fixer un CO₂ par le cycle réductif de l'acide citrique et probablement 3 seulement dans celui de l'acétyl CoA (Schlegel 1986).

¹ Segerer et al. (1986) ont proposé de reclasser Sulfolobus brierleyi dans le nouveau genre Acidianus eu égard à son métabolisme bivalent du soufre (oxydation en conditions aérobies, réduction en conditions anaérobies).

Evolutivement, c'est donc le cycle le plus "cher" qui semble avoir été privilégié, mais le succès d'un métabolisme n'est certainement pas lié, uniquement à son rendement énergétique et d'autres facteurs - comme ses possibilités de régulation ou son intégration dans l'anabolisme - doivent certainement entrer en ligne de compte.

2.2. Fixation du CO₂ chez les Hydrogenobacter

Nous venons de voir que des alternatives au cycle de Calvin se trouvant chez de nombreuses bactéries. Mis à part le cas encore incertain de Chloroflexus aurantiacus (Holo et Sirevag 1986), toutes ces bactéries sont anaérobies ou appartiennent aux Archéobactéries.

Les résultats des tests enzymatiques effectués chez les Hydrogenobacter sont cependant sans équivoque et indiquent clairement qu'il n'y a pas de cycle de Calvin chez ces Eubactéries aérobies. Nous discuterons les implications évolutives de cette caractéristique sous le point 5.

Une fois l'absence de cycle de Calvin démontrée, il convenait de chercher quel était le chemin permettant à ces bactéries de fixer le CO₂.

Les travaux de Shiba et al. (1982, 1984, 1985) sur des souches d'Hydrogenobacter thermophilus permettant d'affirmer que ces bactéries fixent le CO₂ par un chemin très semblable à celui de Chlorobium limicola, soit par le cycle réductif de l'acide citrique. Quoique nous n'ayons pas répété ces tests sur les autres groupes d'Hydrogenobacter, il paraît raisonnable de supposer que tous les Hydrogenobacter utilisent le même mécanisme de fixation.

Les évidences pour le fonctionnement d'un cycle tricarboxylique inversé sont principalement:

- La présence des deux enzymes clés de cette voie, l'ATP citrate lyase et l' α -cétoglutarate synthétase.
- Le marquage rapide de composées liées au cycle tricarboxylique lors d'incubation avec du $^{14}\text{CO}_2$.

Les détails de ce cycle sont donnés dans la Figure 17.

3. Le métabolisme des composées réduits du soufre

Les bactéries capables d'oxyder les composées réduites du soufre en conditions aérobies sont nombreuses et peuvent être classées en plusieurs groupes en fonction de leurs différentes caractéristiques physiologiques à savoir:

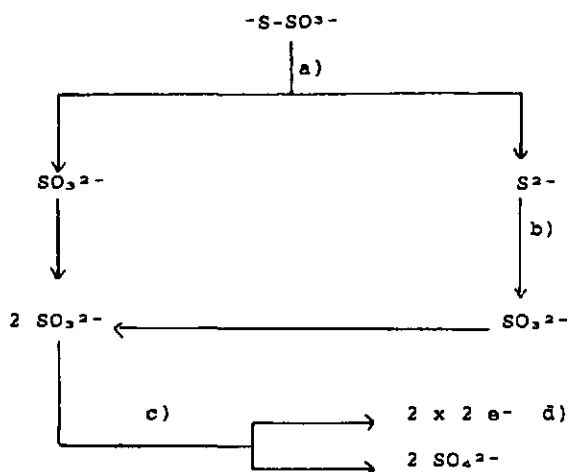
- Les Thiobacillus chimioolithotrophes obligatoires, capables de tirer leur énergie de l'oxydation des composées réduites du soufre (Smith et Hoare 1977, Matin 1978).
- Les Thiobacillus chimioolithotrophes facultatifs qui, en plus des composées réduites du soufre, peuvent utiliser des composées organiques comme source d'énergie. L'oxydation simultanée des deux types de substrats est possible permettant ainsi une croissance mixotrophe (Matin 1978, Gottschal et Kuenen 1980a, Smith et al. 1980). Il faut inclure dans ce groupe les hydrogénobactéries capables d'utiliser le thiosulfate comme source d'énergie (Friedrich et Mitranga 1981).
- Les bactéries lithohétérotrophes qui peuvent tirer parti de l'oxydation de composées réduites du soufre sans pour autant être à même de se développer en conditions autotrophes, p.ex. Thiobacillus perometabolis (Tuttle et Jannasch 1972, Gottschal et Kuenen 1980b).
- Les bactéries phototrophes qui peuvent pousser chimioolithotrophiquement à l'obscurité avec les composées réduites du soufre (Kämpf et Pfennig 1980).

Ce sont surtout les travaux de Friedrich et Mitrang (1981) qui ont retenu notre attention; et des hydrogénobactéries étaient capables d'oxyder le thiosulfate, cela valait la peine de vérifier l'existence de cette propriété chez les Hydrogenobacter pour qui elle s'avérerait doublement intéressante: d'un point de vue physiologique, en offrant à ces bactéries strictement lithotrophes une source d'énergie et d'électrons autre que l'hydrogène et à un niveau écologique. Ce type de métabolisme refléterait une adéquation au milieu naturel puisque, nous l'avons dit, les milieux géothermaux sont riches en composés soufrés, principalement en sulfures et en soufre élémentaire (voir chapitre IV).

Les différentes expériences décrites sous le point 14 du chapitre VA nous ont permis de vérifier la réalité de l'utilisation du thiosulfate par les Hydrogenobacter, soit seul, soit en conjonction avec l'hydrogène.

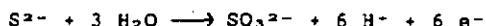
3.1. Mécanisme d'oxydation du thiosulfate

Le mécanisme exact de l'oxydation du thiosulfate n'est pas entièrement élucidé. Chez les Thiobacillus, le schéma proposé dans les années '80 est le suivant :

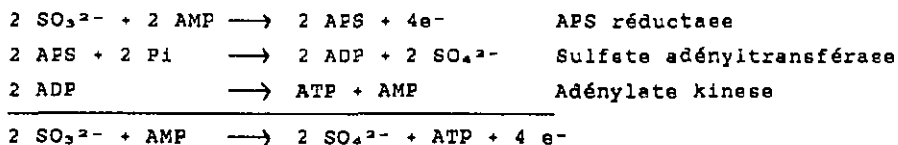


a) Le clivage du thiosulfate fait intervenir, soit une thiosulfate réductase produisant ainsi un sulfure et un sulfite, soit une rhodanèse couplée à un accepteur - probablement l'acide lipoïque réduit (Silver et Kelly 1976) - et produisant alors un sulfite et une forme très réactive de soufre hydrophile. Dans les deux cas, cette étape consomme de l'énergie, mais le fait que les rendements de croissance avec le thiosulfate ou avec des sulfures soient sensiblement égaux semble indiquer que cette consommation d'énergie n'est pas très élevée (Timmer-ten-Hoor 1976).

b) L'oxydation des sulfures en sulfite se fait par une sulfite réductase.

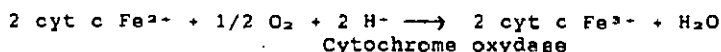
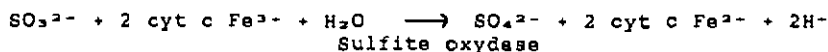


c) L'oxydation du sulfite en sulfate nécessite la formation d'un composé phosphaté, l'adénosine phosphosulfate (APS) (Peck 1960, Peck et Stulberg 1962).



On a là une réaction inverse à celle utilisée par les sulfatoréductrices pour transformer les sulfates en sulfites, avec notamment une phosphorylation au niveau du substrat.

Charles et Suzuki (1966a,b) ont mis en évidence un autre mécanisme possible:



APS réductase et cytochrome c oxydase ayant pu être mis en évidence chez de nombreux Thiobacillus (Kelly 1982), il est difficile de savoir quel est le mécanisme prédominant.

d) Les électrons entrent dans la chaîne respiratoire au niveau des cytochromes c pour les thiobacilles aérobies, il y a donc un seul site de couplage ATP possible. Chez Thiobacillus denitrificans, les électrons entrent au niveau des cytochromes b ou de flavoprotéines, on aura donc 2 ATP formés par paire d'électrons transportés. Le NAD⁺ est réduit par un flux inversé d'électrons nécessitant un apport d'énergie.

L'importance des polythionates pour l'oxydation du thiosulfate, suggérée par London et Rittenberg (1964), est actuellement contestée. Même s'il y a formation de polythionates, ceux-ci ne peuvent être métabolisés qu'après des réactions de scission et ils ne sont pas nécessairement des substrats ou des produits de tous les thiobacilles (Kelly 1982).

Chez les bactéries photosynthétiques sulfureuses, l'oxydation du thiosulfate passe aussi par un clivage de cette molécule ce qui se traduit souvent par l'accumulation de soufre élémentaire, soit intracellulairement (Chromatiacées), soit extracellulairement (Chlorobiacées).

3.2. L'oxydation du thiosulfate chez les Hydrogenobacter

L'oxydation, couplée à la photosynthèse, du thiosulfate chez Chromatium souche D a un caractère biphasique (Trüding 1969). Dans la phase initiale, rapide, environ la moitié du soufre du thiosulfate est convertie en sulfate qui provient principalement du groupement sulfonyl. Le soufre accumulé intracellulairement pendant cette phase initiale est oxydé subséquentement en sulfate d'une manière moins rapide.

A quelques détails près, la situation chez les Hydrogenobacter semble similaire, c'est à dire oxydation biphasique du thiosulfate avec, dans une première phase, accumulation extracellulaire du soufre puis, une fois le thiosulfate épuisé, oxydation de ce soufre. Contrairement à ce qu'on observe chez Chromatium cette seconde phase est également très rapide. Le mécanisme de cette oxydation biphasique n'a pas été élucidé. Il est probable que, dans une première phase, on ait la réaction suivante:



Chez Paracoccus denitrificans, l'oxydation du thiosulfate se fait apparemment en une seule étape, sans accumulation transitoire de soufre (Friedrich et Mitschke 1981).

3.2.1. Estimation du rendement de croissance

Une estimation précise du rendement de croissance n'est pas possible, la présence de soufre dans la suspension cellulaire interfère avec l'estimation du poids sec et la détermination de la teneur en protéines. De plus, il faudrait exprimer des rendements partiels pour chacune des deux phases de croissance or la deuxième phase est incomplète suite au dépôt d'une partie du soufre sur les parois du fermenteur. Néanmoins, on peut grossièrement estimer que le rendement global de croissance est supérieur à 10 g/mole thiosulfate. Un tel rendement de croissance se rapproche des valeurs mesurées chez Thiobacillus denitrificans (Tableau 23); sans trop vouloir s'avancer, on peut donc supposer que les électrons sont cédés au niveau des cyt b (ou des flavoprotéines) ce qui distinguerait les Hydrogenobacter des Thiobacillus aérobies.

3.2.2. Variation du taux de croissance

L'augmentation du taux de croissance au cours du temps, quand le thiosulfate est la seule source d'énergie, peut-être expliqué de plusieurs manières différentes:

- Inhibition par le donneur d'électrons.
- Sélection d'un mutant.
- Sensibilité à la concentration en oxygène.

La première hypothèse peut être écartée en considérant que cette phase d'accélération a presque disparu dans le cas de la croissance mixolithotrophe (Fig.15).

La sélection d'un mutant est également peu probable puisque en faisant deux cultures successives avec le thiosulfate comme source d'énergie et en utilisant comme inoculum pour la seconde de ces cultures une aliquote de la première, on observe dans les deux cas ce phénomène d'accélération.

Reste donc la sensibilité à l'oxygène!

On observe que, si la croissance est inhibée en fermenteur avec une phase gazeuse contenant 5 % d'oxygène et une agitation minimale, la même concentration n'est pas inhibitrice en flacons non agités. Cette première preuve de la sensibilité à l'oxygène est corroborée par les résultats obtenus lors de la croissance en conditions mixolithotrophes. L'apport d'hydrogène comme source d'électrons et d'énergie supplémentaire augmente le taux de respiration et abaisse par conséquent la concentration intracellulaire d'oxygène. Dans ces conditions, le taux maximal de croissance peut être atteint plus rapidement, la concentration d'oxygène dans la phase gazeuse perd une partie de son pouvoir inhibiteur.

Considérant ce résultat, il est intéressant de relever les observations faites pour la croissance avec thiosulfate de deux Thiobacillus thermophiles. Williams et Hoare (1972) rapportent que la croissance avec thiosulfate d'un Thiobacillus thermophile isolé de Yellowstone est faible et s'arrête alors qu'à peine plus de la moitié du thiosulfate initialement présent est consommé. Pourtant, les suspensions cellulaires de cette même bactérie sont capables d'une oxydation totale! Une diminution des concentrations en thiosulfate ou en phosphate, une modification du milieu minéral ou une aération continue avec de l'air enrichi en CO_2 n'améliorent pas les choses. Par contre, en présence d'une faible quantité de substrat organique (20 mM acétate), l'oxydation est complète. On peut concevoir que cet apport de matière organique, en permettant une croissance mixotrophe, diminue la sensibilité à l'oxygène; l'acétate excrèterait donc un rôle "protecteur" identique à celui de l'hydrogène dans le cas des Hydrogenobacter.

Un autre Thiobacillus thermophile, T. thermophilica, présente le même phénomène d'oxydation incomplète du thiosulfate (Egorova et Deryugina 1963). Il serait certainement instructif de cultiver ces deux souches avec des pressions partielles d'oxygène réduites.

La sensibilité à l'oxygène est un phénomène courant chez les thermophiles, nous l'évoquerons plus en détail au point 4.

3.2.3. Mixolithotrophie

L'utilisation de l'hydrogène et du thiosulfate est simultanée, la croissance dans ces conditions est plus rapide qu'avec l'hydrogène seul (Tableau 18). Il y a donc expression concomitantes des deux types de métabolismes.

Dans un milieu où l'hydrogène et les composés réduits du soufre sont présents de façon constante, cette possibilité de "jouer sur les deux tableaux" doit représenter un avantage sélectif certain

et traduit l'adaptation optimale de la bactérie à son milieu.

Il serait intéressant de chercher à savoir si toutes les hydrogénobactéries isolées dans de tels milieux sont en même temps des sulfooxydantes et, inversement, si les bactéries isolées comme sulfooxydantes sont capables de se développer en conditions hydrogénotrophes (voir chapitre VII).

4. Relations avec l'oxygène

Plusieurs dérivées de l'oxygène, comme le peroxyde d'oxygène, l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle, sont toxiques pour les cellules qui ont dû mettre au point des systèmes de détoxification. Les enzymes utilisées dans ce but sont des superoxyde dismutases, des catalases et des peroxydases. En réponse à une augmentation de la concentration en oxygène, les bactéries mééophiles réagissent généralement en synthétisant davantage de superoxyde dismutase; chez les bactéries thermophiles, ce sont plutôt les niveaux de catalase ou/et de peroxydase qui sont ajustés, mais ces bactéries réagissent généralement mal à un stress consécutif à une élévation de la concentration en oxygène (Allgood et Perry 1985). Cette mauvaise tolérance à l'oxygène se traduit souvent par une absence de croissance en cultures agitées (Klug et Markovetz 1967, Schenk et Aragno 1979, Allgood et Perry 1985).

La sensibilité à l'oxygène est à mettre en corrélation avec la faible teneur en oxygène dissous des milieux chauds. La solubilité de l'oxygène diminue en effet avec la température et à 90°C, elle n'atteint que 2 % de sa valeur à 20°C (Brock 1978); de plus, une partie de l'oxygène dissous est encore extrait par les bulles de gaz traversant l'eau. Les bactéries thermophiles évoluent donc sous des tensions d'oxygène réduites, ce qui peut peut-être expliquer qu'elles soient moins à même que les mééophiles de faire face à un excès d'oxygène.

Nous avons nous même dans ce travail relevé plusieurs résultats qui pourraient être expliqués par cette sensibilité à l'oxygène:

- Absence de croissance sur milieu solide en conditions standard. Nous avons démontré que l'agent gélifiant n'est pas en cause puisque l'emploi de gélrite à la place d'agar emène aux mêmes résultats (voir chapitre V, point 8). Par contre, une croissance en milieu semi-solide est possible. On peut supposer que les bactéries devant se développer à la surface d'un milieu sont exposées à une trop grande concentration en oxygène et ne peuvent par conséquent pas se développer.
- Absence de sulfoxydation en conditions aérobies
C'est avec le thiosulfate que la croissance est la plus sensible à l'oxygène; c'est aussi avec ce substrat qu'elle est la plus lente au début. L'oxygène est donc moins rapidement consommé et sa concentration d'autant plus critique. La possibilité d'une croissance sur milieu solide avec le thiosulfate comme seule source d'énergie et d'électrons (Alfredsson et al. 1986), est en contradiction avec cette remarque. Nous n'avons pour notre part pas réussi à répéter cet essai. Il faut à ce propos souligner que les chercheurs islandais réalisent leurs cultures dans d'autres conditions que celles que nous avons choisies (Kristjansson et al. 1985), d'où peut-être certaines divergences dans les résultats.
- Sensibilité des cultures liquides à l'oxygène dissous
Quelle que soit la source d'électrons, la croissance est initialement très sensible à la concentration en oxygène. Pratiquement, cela oblige à amorcer les cultures avec une agitation minimale et une phase gazeuse à faible proportion d'O₂, particulièrement avec le thiosulfate comme substrat. En cours de croissance, la consommation d'O₂ augmente et la concentration d'oxygène dans la phase gazeuse de même que la vitesse d'agitation deviennent moins critiques (voir aussi point 3.2).

Si la croissance est inhibée par une trop forte concentration en oxygène, elle l'est aussi si cette concentration devient limitante. Le rapport surface/volume des cultures est donc important, si ce rapport est trop faible (éprouvettes, erlenmeyers) la croissance est médiocre.

De toute évidence, au-dessus comme au-dessous d'un certain seuil de pression partielle en oxygène, la croissance est très mauvaise. Cette exigence pour une pression en oxygène donnée est d'autant plus marquée que le métabolisme est lent, p.ex. en début de croissance ou avec le thiosulfate comme unique substrat.

En se basant sur ces résultats ainsi que sur les concentrations en oxygène dissous des milieux étudiés, qui sont de l'ordre du pourcent (Tableau 7), on peut s'interroger sur l'opportunité de cultiver et surtout d'isoler ces bactéries avec 5 % d'oxygène dans la phase gazeuse.

5. Considérations taxonomiques et évolutives

Nous nous proposons, dans ce chapitre, de reprendre les résultats de la caractérisation du genre Hydrogenobacter et d'en dégager les conséquences taxonomiques et surtout évolutives. Il est évident que cette discussion, surtout dans sa seconde partie, fait une part large à la spéculation aussi tenons-nous à nuancer nos propos. Malgré nos efforts visant à une grande objectivité, il est inévitable qu'une discussion sur l'évolution trahisse des opinions personnelles. Nous nous sommes simplement efforcés de les présenter comme telles, sans prétendre énoncer des vérités absolues.

5.1. Remarques sur la taxonomie bactérienne

Le handicap majeur de la taxonomie bactérienne est certainement la taille réduite du sujet à étudier et à classer. L'observation directe n'est généralement possible que sur l'organisme isolé et

ne fournit qu'un nombre restreint d'informations. Il est donc nécessaire de se baser sur les propriétés (physiologiques, enzymologiques, génétiques...) des organismes. Cette approche indirecte a des inconvénients. Tout d'abord, les propriétés ainsi mises en évidence le sont sur des organismes sélectionnés, cultivés dans un milieu artificiel et en culture pure. Ensuite, la durée d'une caractérisation complète peut être rédhibitoire et inciter à saccager cette étape "fastidieuse" pour se consacrer à des études d'apport plus évident et plus immédiat. Finalement, les progrès méthodologiques constants permettent la mise en évidence d'un nombre croissant de propriétés rendant quelquefois caduques les anciennes classifications. Ainsi, l'essor rapide des nouvelles méthodes d'analyse du génome a fourni une moisson de résultats qui nous a obligé à une révision, parfois drastique, de la systématique bactérienne.

Ces nouvelles méthodes ont d'ailleurs suscité une vague d'enthousiasme; il paraissait enfin possible de comparer des bactéries entre elles d'une manière quantitative et de les situer sans erreur aux niveaux taxonomiques les plus élevés. Sans remettre en question la valeur intrinsèque de ces méthodes, force est de constater que la construction élaborée sur leur base manque de fondations! L'importance de divers problèmes, comme p.ex. l'impact de l'échange horizontal de gènes chez les bactéries, commence seulement à être débattue. Quoique l'idée du superorganisme bactérien énoncée par Sonea et Peneset (1980) soit peut-être excessive, elle a le mérite de mettre en question la valeur d'une systématique classique appliquée à des organismes qui échappent partiellement à l'évolution darwinienne.

Peu de chercheurs également se préoccupent de connaître le lien entre la réalité du milieu naturel et celle du laboratoire. Le problème est certes ardu mais se pose avec acuité à tout chercheur qui constate les fréquentes modifications de propriété des souches cultivées en laboratoire (stabilisation, adaptation, dégénérescence). S'il est évident que culture en milieu artificiel et isolement constituent des simplifications indispensables à l'étude des souches bactériennes, il ne faudrait

pas cependant perdre de vue leurs actions potentielles sur les caractéristiques du sujet étudié.

La taxonomie actuelle dispose d'outils puissants et bien adaptés, leur utilisation permet une classification plus ou moins aisée des bactéries que nous ne contestons pas et dont l'utilité est d'ailleurs indiscutable. Cependant, l'image ainsi obtenue pourrait bien n'être qu'un reflet distordu de la réalité!

5.2. Taxonomie du genre Hydrogenobacter

Traditionnellement, les bactéries sont étudiées sous le double aspect de leurs caractéristiques phénotypiques et génotypiques, ces dernières permettant d'affiner et généralement de confirmer les résultats obtenus par les méthodes plus classiques.

Il est extrêmement rare d'observer des désaccords profonds entre les résultats de ces deux approches et cela en toute logique puisque le génotype se doit d'être l'expression du phénotype. On peut cependant relever le cas de Prochloron, ce symbiote d'ascidie dont les caractéristiques phénotypiques en font un ancêtre potentiel des chloroplastes des chlorophytes et des plantes vasculaires alors que les analyses génotypiques mettent en évidence ses affinités avec le phylum des cyanobactéries.

De tels cas sont cependant rares et on peut se demander comment interpréter les résultats obtenus chez les Hydrogenobacter.

Dans ce groupe, les caractéristiques phénotypiques et génotypiques fournissent des résultats à première vue contradictoires. Au niveau phénotypique, les différences entre les diverses souches étudiées sont ténues; les tests réalisés ont surtout permis de mettre en évidence de nombreuses similitudes. Cependant, du fait de l'autotrophie obligatoire, le nombre de tests facilement accessibles est réduit et l'efficacité d'une caractérisation phénotypique limitée.

A l'encontre de cette homogénéité phénotypique, les résultats des hybridations indiquent clairement que les Hydrogenobacter forment cinq groupes distincts. Même si les valeurs ont été mesurées dans des conditions sélectives qui pourraient amener à une sous-estimation des pourcentages d'homologie, ces différences restent assez importantes pour justifier la partition du groupe.

Ces résultats peuvent être interprétés de deux manières différentes (au moins) :

- Les résultats génotypiques trahissent de profondes divergences entre les souches étudiées. Il convient donc de placer ces bactéries dans cinq genres différents. Les parentés phénotypiques observées ne sont que le reflet d'une convergence évolutive et d'un manque de données comparatives.
- Comme révélé par leur parenté phénotypique évidente et les valeurs comparables de pourcentage G + C, ces bactéries appartiennent à un même genre. Le résultat déroutant des hybridations pourrait être expliqué d'une part par les conditions très sélectives du test, d'autre part en évoquant l'isolement géographique des souches.

On sait que les bactéries sont en contact génétique entre-elles, échangeant des gènes de manière intra et inter spécifique. Cependant, des bactéries aux niches écologiques très sélectives et géographiquement discontinues doivent échapper à ce brassage génétique et évoluer de manière indépendante. Cela pourrait conduire aux divergences génotypiques observées; le phénotype, lui, serait resté stable, principalement à cause de la forte pression sélective.

Nous constatons qu'effectivement les groupes isolés correspondent bien à des groupes géographiques; on a ainsi des Hydrogenobacter japonaise, russe, islandaise et italienne. La subdivision de ces derniers résulterait plutôt d'un isolement écologique. Les Hydrogenobacter du groupe T3 sont en effet systématiquement isolés à des températures supérieures à 70°C;

aux températures inférieures, on isole des Hydrogenobacter du groupe T13. Cette loi se vérifie particulièrement bien lors d'isolement le long d'un gradient thermique.

D'après ce schéma, nous aurions donc une spéciation géographique. Très fréquent chez les Eucaryotes, ce phénomène n'a été que rarement pris en considération chez les bactéries, principalement à cause de leur dispersion aisée. Cependant, pour des bactéries vivant dans des environnements extrêmes à faible densité géographique, les distances à parcourir d'une niche à l'autre deviennent considérables et, en l'absence de forme de résistance (donc de transport), l'isolement est bien réel et peut impliquer une spéciation géographique.

Malgré la carence de faits expérimentaux étayant l'un ou l'autre de ces schémas, nous penchons plutôt pour le deuxième, en tout cas au niveau de ses implications taxonomiques. Il nous paraît en effet indispensable de réunir au niveau générique des bactéries dont la parenté phénotypique est si marquée et les pourcentages G + C quasiment identiques.

Nous proposons donc de regrouper toutes les bactéries décrites en un seul et même genre tout en assignant à chaque groupe d'homologie un nom d'espèce différent.

La nécessité de confirmer le nouveau genre créé par Kawasumi et al. (1984) ne fait pas de doute si l'on considère les nombreuses originalités de ces bactéries: thermophilie, hydrogénotrophie, sulfoxydation, mécanisme de fixation du CO₂, pourcentage G + C d'environ 40 %, autotrophie obligatoire... tout concourt à les distinguer d'autres genres précédemment décrits.

Le Tableau 24 donne une comparaison des Hydrogenobacter avec d'autres hydrogénobactéries thermophiles précédemment décrites; à cause de leur capacité à utiliser les composés réduits du soufre, nous avons également inclus dans cette comparaison deux bactéries sulfoxydantes autotrophes obligatoires. Il ressort de ce tableau que les Hydrogenobacter forment un groupe original différent de tous les genres précédemment décrits.

Le premier nom de genre publié pour ces organismes est celui de Calderobacterium (Kryukov et al. 1983). Néanmoins, la description du genre Hydrogenobacter (Kawaeumi et al. 1984) est parue dans l'International Journal of Systematic Bacteriology trois mois avant la validation du nom de Calderobacterium (IJSB 1984). Ainsi, selon la règle 27 du code international de nomenclature (Lapage et al. 1985), le nom d'Hydrogenobacter a-t-il la priorité.

Nous proposons donc d'inclure toutes les bactéries décrites dans ce travail dans le genre Hydrogenobacter.

5.3. Description du genre Hydrogenobacter

Mis à part la capacité à utiliser les composés réduits du soufre, la description est celle donnée par Kawaeumi et al. (1984).

Bâtonnet à Gram négatif, 0.3-0.5 / 2-4 μ m; tendance à former des filaments. Non sporulant, non mobile.
Chimolithotrophe utilisant l'hydrogène, le soufre élémentaire et le thiosulfate comme donneurs d'électrons.
Pas de croissance hétérotrophe. Fixation du CO₂ par un cycle tricarboxylique inversé. Ammonium, urée et asparagine peuvent servir de sources d'azote. Température optimale, 70-75°C, pas de croissance à 40 et 90°C. Neutrophile.
Pourcentage G + C: 38-41 %.

La position de ce genre sera discutée sous le point 5.4.

Les cinq espèces de ce genre sont construites sur la base des homologies ADN-ADN et ne peuvent actuellement être nettement distinguées par aucun test phénotypique. Nous proposons de créer les cinq espèces suivantes:

Hydrogenobacter thermophilus (Kawaeumi et al. 1984), espèce type du genre Hydrogenobacter.

Description similaire à celle du genre. Croissance très faible à 80°C. Pourcentage G + C: 38 %.

Souche type: TK-6, isolée de sources chaudes au Japon.

H. hydrogenophilus (Kryukov et al. 1983) Comb. nov.,
synonymie: Calderobacterium hydrogenophilum (Kryukov et al.
1983).

Description similaire à celle du genre. Croissance très
faible à 80°C. Pourcentage G + C: 38 %.

Souche type: Z-829, isolée de sources du système thermal de
geysers de l'Uyan, Kamchatka, URSS.

H. alfredsoni sp. nov. al. fred. son. ii, L. gen. n., dédié à G.
Alfredsson, microbiologiste islandais dont l'équipe a isolé
et caractérisé cet organisme.

Description comme pour le genre. Pas de croissance à 80°C.
Pourcentage G + C: 38 %.

Souche type: H-1 (Kristjansson et al. 1985), isolée de
sources thermales en Islande.

H. octogenarius sp. nov. oc. to. gen. a. riue, L. adj., relié à 80
à cause de la capacité de cet organisme de croître à plus
de 80°C.

Description comme pour le genre. Bonne croissance à 80°C,
température maximale supérieure à 85°C. Pourcentage G + C:
40 %.

Souche type: T3, isolée d'une mare bouillonnante (98°C; pH
6.5) dans la solfatare de San Federigo (Province de
Grosseto, Italie).

H. italicus sp. nov. i. ta. li. cus, L. adj., d'Italie.

Description similaire à celle du genre. Pas de croissance à
80°C. Pourcentage G + C: 38 %.

Souche type: T13, isolée d'une source neutre modérément
chaude (49°C) aux "Terme di Bagnolo" (Fig. 3) près de
Monterotondo Marittimo (Province de Grosseto, Italie)

H. italicus, biovar etnaeus et. nae. us, L. adj., d'Etna.

Description similaire à celle de l'espèce mais croissance
hétérotrophe possible avec: D(+) cellobiose, D(+) fructose,
D(+) glucose, D(+) maltose, D(+) mannose, D(+) saccharose,
acétate, butyrate, o-cétogutarate, D gluconate, malate,

oxaloacétate, pyruvate, succinate, D(+) et L(-) tartrates, DL-alanine, D et L-aspartates, D-glutamate, L-phénylalanine, L-proline, éthanol, glycérol, extrait de levure (Difco) et bouillon nutritif Standard I (Merck).

Pourcentage G + C: 38.6 %.

Souche type: MF3, isolée d'une fumerolle sur l'Etna.

5.4. Position taxonomique du genre Hydrogenobacter

Il est difficile de parler de phylogénie bactérienne sans évoquer, au moins dans leurs grandes lignes, quelques théories de l'évolution bactérienne, aussi ferons nous un rapide bilan de nos connaissances dans ce domaine.

5.4.1. Quelques notions sur l'évolution des bactéries

Broda (1970) et Margulis (1972) ont proposé une séquence possible des différents mécanismes apparus au cours de l'évolution. Dans ce schéma spéculatif, les organismes fermentatifs sont donnés comme les plus anciens; ils se seraient développés dans un environnement anaérobie, riche en composés organiques, l'énergie étant obtenue par phosphorylation au niveau du substrat.

L'environnement étant riche en précurseurs de macromolécules, ces organismes étaient probablement capables d'assimiler ces "briques" toutes faites. La prolifération de tels organismes limitant la disponibilité de ces précurseurs, il y aurait eu alors accroissement des capacités biosynthétiques. La compétition pour les composés organiques devient maximale; les organismes développant la capacité d'exploiter des sources alternatives de carbone et d'énergie en retirent un avantage sélectif important.

L'utilisation de la lumière étant, en conditions anaérobies, une des sources possibles d'énergie, il y aurait tout d'abord eu développement de bactéries photosynthétiques hétérotrophes. Ensuite serait apparue la capacité de fixer le CO₂ et la faculté

d'oxyder des composés inorganiques tels que le soufre, l'hydrogène et finalement l'eau. Le développement de la photosynthèse oxygénique établit un environnement sérobie permettant l'essor des chimolithotrophes, descendants plus ou moins directs des photosynthétiques.

Les résultats obtenus par analyse des ARN 16S (Fox et al. 1980) remanient quelque peu ce schéma, principalement en montrant que le phénotype photosynthétique est aussi ancien que le phénotype clostridien. Les Eubactéries pourraient avoir comme ancêtres des bactéries photosynthétiques, éventuellement autotrophes.

La découverte des environnements hydrothermaux sous-marin, l'étude de leur géochimisme et de leur biologie ont également amené un renouveau dans les théories de l'évolution. De tels environnements pourraient avoir été le "berceau" de la vie, ainsi que le supposent Baross et Hoffman (1985).

" We propose that life developed and evolved in a primeval, shallow ocean in association with the multiplicity of gradients established by what are now known to have been the important features of the early Archean: the tectonism associated with seafloor spreading and the resultant hydrothermal alteration of the newly-emplaced oceanic crust and the composition of the ocean and atmosphere of the early Earth".

Baross et Hoffman (1985)

Les propriétés supputées de ces environnements primitifs sont: un environnement chimiquement réducteur, probablement chaud ($> 30^{\circ}\text{C}$ $\rightarrow 100^{\circ}\text{C}$) peu profond (maximum 1000-2000 mètres) et considérablement plus actif tectoniquement qu'il ne l'est aujourd'hui (Baross et Hoffman 1985). La chaleur dérivée du refroidissement hydrothermal de nouvelles croûtes océaniques est la source d'énergie permettant de convertir des précurseurs inorganiques en composés organiques. Les plus importantes processus microbiens apparus initialement dans ces

environnements étaient probablement basés sur l'utilisation anaérobie de l'hydrogène et du soufre.

Bien que les systèmes hydrothermaux actuels soient géologiquement et géophysiquement très semblables à leur contrepartie de l'archéen, le système océanique environnant est considérablement plus oxydé. La présence d'autres accepteurs d'électron (NO_3^- , Fe^{2+} , SO_4^{2-}) et d'une variété de composés additionnels a permis le développement d'une communauté physiologiquement très diverse.

Dans ces milieux, la chaîne alimentaire est basée sur les bactéries chimiosynthétiques alors que tous les autres écosystèmes actuels - excepté peut-être quelques environnements extrêmes - sont basés sur la photosynthèse oxygénique (Fig.18).

Nous n'avons ni la compétence ni le désir de discuter plus en détail ces éléments d'information générale concernant l'évolution. Aussi, des idées esquissées ci-dessus, retiendrons-nous simplement les notions suivantes:

- L'environnement primitif était réducteur, l'oxygène n'est apparu que suite à la photosynthèse oxygénique.
- La vie a probablement évolué à partir d'organismes thermophiles (voir chapitre II).
- Les bactéries phototrophes occupent une place clé dans l'évolution et sont traditionnellement considérées comme les ancêtres des chimolithotrophes. Cette filiation est contestable car elle va à l'encontre d'une origine thermophile de la vie. On ne rencontre en effet pas de phototrophes au-dessus de 70°C alors que les organismes chimolithotrophes peuvent se développer à plus de 100°C. Qui plus est, la photosynthèse chlorophyllienne est absente chez les Archéobactéries, règne évolutivement très ancien. Dans le schéma de Baross et Hoffman (1985) cette filiation est d'ailleurs inversée.

Il n'en reste pas moins que les bactéries photosynthétiques sont probablement à l'origine des phylums d'Eubactéries lithotrophes aérobies.

5.4.2. Phylogénie des Hydrogenobacter

Avec ces quelques pièces du puzzle évolutif, où placer les Hydrogenobacter, c'est à dire des organismes thermophiles, autotrophes obligatoires, utilisant l'hydrogène ou les composés réduits du soufre comme source d'énergie et d'électrons et fixent le CO_2 par un cycle tricarboxylique inversé?

Procédons en détaillant chacune de ces caractéristiques.

- Thermophilie

Nous avons déjà vu, dans le chapitre II, quelques faits argumentant pour le caractère primitif de la thermophilie. Les propositions de Beroes et Hoffman (1985) abondent dans ce sens aussi, bien que consciente que le débat est loin d'être clos, maintiendrons-nous que la thermophilie peut constituer un caractère primitif.

- Autotrophie obligatoire

On trouve des autotrophes obligatoires dans tous les groupes de chimolithotrophes et, taxonomiquement, autotrophes obligatoires et facultatifs sont souvent liés à l'intérieur d'un même genre. Ce caractère nous apparaît donc plus comme un trait écologique qu'évolutif. La dichotonie généraliste - spécialiste résulterait d'une divergence dans les stratégies d'adaptation au milieu et ne pourrait être mise en corrélation avec un schéma évolutif. Nous pouvons simplement supposer que, les Hydrogenobacter étant des chimolithotrophes aérobies, leur développement est postérieur à l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère et donc "récent".

- Fixation du CO₂ par un cycle tricarboxylique inversé
La Figure 19 donne la répartition des trois voies de fixation du CO₂ dans l'arbre évolutif (simplifié) des bactéries.

On constate que la fixation du CO₂ par un cycle tricarboxylique inversé se retrouve aussi bien chez les Archéobactéries p.ex. Sulfolobus brierley (Kandler et Stetter 1981) que chez les Eubactéries p.ex. Chlorobium limicola (Evans et al. 1966, Fuchs et al. 1980a,b), elle appartient probablement à l'héritage commun des deux règnes procaryotes.

Il en va de même pour la voie de l'acétyl CoA que l'on retrouve aussi bien chez les méthanogènes (Fuchs 1986) que chez les chloroflexacées (Kato et Sirevag 1986).

La fixation du CO₂ par le cycle de Calvin apparaît comme plus tardive et confinée aux Eubactéries. C'est aussi le seul cycle qu'on ne retrouve pas chez des bactéries hautement thermophiles. Il peut y avoir à cela, soit une raison biochimique (thermosensibilité de certaines enzymes), soit une cause évolutive, le cycle de Calvin serait alors à considérer comme plus récent.

- Utilisation de l'hydrogène et du soufre
D'après Urey (1952), les bactéries capables d'utiliser l'hydrogène seraient des fossiles vivants, témoins d'une époque où les concentrations en hydrogène étaient considérablement plus élevées qu'actuellement.

Si la position taxonomique de nombreuses hydrogénobactéries invalide cette assertion (Woese et al. 1985), il n'en reste pas moins que les métabolismes lithotrophes basés sur l'utilisation de l'hydrogène et du soufre apparaissent comme très anciens. En conditions anaérobies, on trouve de tels métabolismes chez plusieurs bactéries photosynthétiques et surtout chez de nombreuses Archéobactéries (Desulfurococcus spp., Thermoproteus spp., Pyrodictium spp...).

L'utilisation du soufre comme donneur d'électrons est plus récente puisqu'elle implique une atmosphère oxydée (ou la lumière). Cependant, elle existe chez certaines Archéobactéries comme p.ex. Sulfolobus brierley qui peut utiliser le soufre, soit comme accepteur d'électron - en conditions anaérobies -, soit comme donneur d'électrons - en conditions aérobies - (Segerer et al. 1986).

D'après l'hypothèse de Baross et Hoffman (1985), le métabolisme du soufre apparaît comme primordial puisque ce serait les bactéries sulforéductrices qui seraient à la base de l'arbre évolutif.

Nous constatons donc que, hormis leur dépendance vis à vis de l'oxygène, les Hydrogenobacter présentent de nombreux caractères primitifs: thermophilie, fixation du CO₂ par un cycle tricarboxylique inversé, rôle central du soufre et de l'hydrogène dans leur métabolisme.

Sur la base des données connues, nous allons essayer de préciser leur position taxonomique.

Nous pouvons déjà exclure une appartenance au groupe des Archéobactéries en nous basant sur la sensibilité à la pénicilline, la présence d'esters glycériques comme lipides membranaires (Kawasumi et al. 1984) et l'ultrastructure de la paroi.

Comme mentionné précédemment, les bactéries lithotrophes à Gram négatif, aérobies, peuvent généralement être rattachées aux bactéries photosynthétiques. Dans le Tableau 25, nous donnons les principales caractéristiques des Hydrogenobacter avec leur distribution chez les différents groupes de bactéries photosynthétiques. Woese et al. (1985) ont montré que la plupart des hydrogénobactéries s'apparentent au groupe des bactéries pourpres. Cependant, sur la base de ce tableau, les Hydrogenobacter apparaissent plutôt proches des bactéries photosynthétiques vertes, spécialement des Chlorobiaceae, même si

celles-ci, contrairement aux Chloroflexaceae, ne possèdent pas de représentants thermophiles (dans l'état actuel de nos connaissances). Les Hydrogenobacter pourraient donc être un des rares groupes d'hydrogénobactéries à Gram négatif à ne pas appartenir à l'embranchement des bactéries pourpres.

Nous ne pouvons bien entendu pas exclure que les Hydrogenobacter fassent partie d'un autre embranchement que ceux envisagés ci-dessus. Leur position taxonomique exacte ne pourra être précisée que par analyse des ARN 16S.

VI HYDROGENOBACTERIES THERMOPHILES, SPORULANTES *****

Les bactéries aérobies formant des endospores, généralement des bâtonnets à Gram positif, sont actuellement classées dans le genre Bacillus.

L'insuffisance de ces critères apparaît clairement quand on considère la gamme des pourcentages G + C des représentants de ce genre. Celle-ci s'étend en effet d'un peu plus de 30 % à près de 70 %, soit beaucoup plus qu'il n'est communément de mise dans un même genre.

L'incohérence phénotypique de ce genre a été mise en exergue par Claus et Barkley (1986). L'hétérogénéité phylogénétique de ce groupe a également été soulignée à plusieurs reprises (Fox et al. 1977, Stackebrandt et Woese 1979, Stackebrandt et al. 1987).

La taxonomie des Bacillus n'étant pas notre propos, nous nous rangerons à la définition du genre telle qu'elle est donnée par Claus et Berkeley (1986).

Seules deux espèces de Bacillus utilisant l'hydrogène avaient été décrites avant ce travail: Bacillus pycnoticus (Grohmann 1924) et B. schlegelii (Schenk et Aragno 1979).

La première de ces deux espèces n'a été que très partiellement caractérisée et n'est actuellement plus disponible; on peut d'ailleurs, en étudiant la publication de Grohmann (1924), mettre en doute la pureté de la culture.

La seconde est une bactérie thermophile isolée de milieux froids, particulièrement de sédiments lacustres. La découverte de cette bactérie a constitué le point de départ de notre recherche sur les hydrogénobactéries thermophiles. Un des buts des isolations

réalisées dans les milieux géothermaux était en effet de tenter d'isoler Bacillus schlegelii de ce qui aurait pu être son milieu naturel. Nous reviendrons d'ailleurs en détail sur l'écologie de cette bactérie. Quoiqu'il en soit, les isollements effectués nous ont permis d'obtenir, outre les Hydrogenobacter déjà décrits (voir chapitre V), diverses hydrogénobactéries sporulantes, thermophiles, qui seront décrites dans cette partie du travail.

Les Bacillus ont été les premiers organismes thermophiles étudiés. Citons notamment l'isolement, par Miquel en 1879, d'un organisme sporulant, croissant à 73°C et isolé...des eaux de la Seine (Miquel 1888)! Ce sont aussi les plus couramment utilisées dans la recherche des clés physiologiques de la thermophilie.

A ce succès, nous voyons deux raisons principales: la facilité de culture, les Bacillus sont généralement peu exigeants et surtout très résistants; leur répartition ubiquiste, les Bacillus thermophiles peuvent en effet être aisément isolés de sols tempérés où les conditions de température sont, en apparence du moins, loin d'être favorables.

Cette présence de microorganismes thermophiles dans des sols froids ne manque pas d'être intrigante. Allen (1953) a démontré qu'il existe réellement une population de Bacillus thermophiles présente dans les sols tempérés et qu'il ne s'agit pas de mutants sélectionnés par les conditions de culture en laboratoire.

On peut dès lors proposer deux théories pour expliquer ce fait:

- Développement in situ

L'action directe du soleil sur les couches superficielles du sol est suffisante pour les échauffer considérablement; de même, fermentations et putréfactions, effectuées au départ par des organismes mésophiles, peuvent dégager assez de chaleur pour créer des conditions locales favorisant le développement d'organismes thermophiles.

Dans cette optique, les Bacillus thermophiles pourraient être considérés comme des variants de Bacillus mésophiles. Le succès des expériences de thermoadaptation semble argumenter dans ce sens.

- Dormance

Les spores sont des organelles extrêmement résistantes. Il est concevable que les spores de Bacillus trouvées dans les sols froids soient d'origine allochtone, en provenance de milieux aux conditions plus favorables, et ne se trouvent qu'à l'état dormant dans les milieux froids. On expliquerait ainsi la présence de spores viables de thermophiles trouvées dans des carottages de bassins océaniques d'âge estimé à plusieurs milliers d'années (Bertholomew et Rittenberg 1949, Bertholomew et Paik 1966).

Le cas de Bacillus schlegelii (Schenk et Aragno 1979) pourrait relever d'une même explication.

Notons que les deux hypothèses ne s'excluent pas, le cas de chaque espèce étant à considérer séparément.

D'une manière générale, on peut supposer que les Bacillus thermotolérants tels: B. subtilis, B. licheniformis, B. coagulans, B. brevis, B. stearothermophilus peuvent très bien se développer dans des sols tempérés en profitant des élévations locales et temporaires de température.

Les Bacillus thermophiles stricts comme B. schlegelii, B. acidocaldarius, B. caldotenax¹ et B. caldolyticus¹ relèvent plus probablement de la deuxième explication et les milieux tempérés ne sont pour eux, au mieux, que des "frigos à spores". Ces idées seront reprises dans la discussion.

¹ Noms d'espèces non validés.

Il est regrettable que la plupart des recherches fondamentales sur les bactéries thermophiles aient pris comme sujets d'expérimentation des Bacillus appartenant au premier de ces deux groupes, des Bacillus thermophiles facultatifs. Par ce choix, on a bien sûr cherché à minimiser les différences entre les souches étudiées en les choisissant dans un même genre, voire dans une même espèce; mais peut-être a-t-on, de par le choix d'organismes si particuliers, biaisé le problème. La présence de spores - ou plus largement d'organes de résistance - ainsi que la distribution écologique très large de ces bactéries les distinguent en effet de la plupart des thermophiles strictes isolées de milieux géothermaux. La généralisation des résultats obtenus avec ces modèles un peu trop spéciaux n'est donc pas évidente. Il ne faudrait pas que Bacillus stearothermophilus devienne l'Escherichia coli des thermophiles!

A) RESULTATS

1. Bacillus tusciae

A plusieurs reprises, nous avons isolé des hydrogénobactéries à spore ovale, acidophiles, de la solfatara de San Federigo. Au vu de ces quelques caractéristiques, il ne pouvait s'agir de souches de B. schlegelii. Nous avons donc entrepris de chercher leur position taxonomique.

1.1. Isolément

Le Tableau 26 donne les sites, avec leurs caractéristiques de température et de pH, où les Bacillus ont été isolés (voir aussi Tableau 10).

Les souches ont été purifiées en milieu solide, en conditions autotrophes et acidophiles (pH initial: 3.5). Un accent a été mis sur la caractérisation des souches T2, choisie comme souche type, et T201.

1.2. Morphologie

Ces bactéries sont des bâtonnets sporulants de 0.8/ 4-5 μm . Les endospores sont ovales, déformantes, subterminales, 1.2 x 1.8 μm (photo 13). On observe un seul flagelle, inséré latéralement. Les bactéries ne sont cependant pas mobiles lors d'observations au microscope, probablement à cause des conditions non physiologiques d'observation (température trop basse).

Les cellules accumulent du PHB quand elles sont cultivées en milieu carencé en azote.

Les cellules jaunes ont un Gram positif. En microscopie électronique, les parois présentent une micromorphologie typique des Gram positifs; aucune structure de surface ne peut-être observée.

1.3. Caractéristiques des cultures

Ces Bacillus poussent très bien en bouteilles ou en flacons de Fernbach, sans agitation. Dans ces conditions, une pellicule blanche se forme à la surface des cultures.

Contrairement à ce que nous avons observé chez Hydrogenobacter, la croissance en éprouvettes est possible bien que plus faible qu'en bouteilles.

En milieu solide, les colonies sont étalées, de couleur crème, avec une pellicule crayeuse en surface.

Lors de la culture d'une grande quantité de cellules, le milieu de culture se colore en jaune. Ce pigment hydrosoluble a un pic d'absorption à 410 nm; il n'a pas été caractérisé.

1.4. Caractéristiques de croissance

La croissance se fait dans du milieu minéral de base acidifié à pH 3.5 (HCl 1/2 conc.). Ce milieu n'est que peu tamponné et, après croissance, le pH remonte à 6.

■
Pour déterminer le pH optimal, nous avons travaillé avec un milieu modifié où la concentration en phosphate est réduite et 50 mM d'acide tartrique ajoutés. Dans ces conditions, le pH optimal est de 4.2 à 4.8 (Fig.20). Nous utiliserons ce milieu tamponné à pH 4.5 pour les tests suivants.

La température optimale est d'environ 55°C. A 37°C comme à 65°C, la croissance n'est plus possible.

La croissance en fermenteur (conditions autotrophes) est exponentielle avec un temps de génération de : $\mu = 0.11$ (temps de doublement, 6.5 h), à condition que la concentration en oxygène soit régulièrement ajustée de 5 % à 25 % (Fig.21). On obtient environ 2.5 g de cellules (poide sec)/l. Remarquons que même en pleine croissance exponentielle, le pourcentage de spores est très élevé.

1.5. Caractéristiques nutritionnelles

1.5.1. Sources de carbone

Toutes les souches sont capables d'utiliser les substances suivantes comme source de carbone et d'énergie: acétate, butyrate, α -cétoglutarate, oxalate, succinate, L-glutamate, butanol et phénol.

Quelques substances ne sont métabolisées que par une partie des sept souches testées, ce sont: malate (5/7), malonate (4/7), L-aspartate (2/7), L-asparagine (1/7), L-arginine (1/7), isoleucine (5/7), valine (3/7), éthanol (3/7) et propanol (2/7).

Ne sont pas utilisés: L(+) arabinose, D(+) cellobiose, D(-) fructose, D(+) galactose, D(+) glucose, D(+) mannose, D(+) maltose, L(+) rhamnose, D(+) saccharose, L(-) sorbose, D(+) tréhalose, D(+) xylose, benzoate, citrate, formiate, D gluconate, mesaconate, D(+) L(-) et mésotartrates, oxalate, pyruvate, DL-alanine, D-aspartate, L-cystéine, D-glutamate, glycine, L-histidine, L-méthionine, L-phénylalanine, L-proline, L-tryptophane, L-sérine, glycérol, D(-) mannitol, méthanol.

Les détails pour chaque souche sont données dans le Tableau 27.

En milieux complexes, la croissance est possible avec de l'extrait de levure (Difco) à pH 5 mais pas à pH 3.5 (l'extrait de levure tamponne le milieu, le pH de 3.5, trop bas pour permettre la croissance, est maintenu). A aucun de ces deux pH la

croissance n'est possible dans du bouillon nutritif (Difco) ou du bouillon Standard 1 (Merck).

Ce spectre de substrats assez réduit offre des similitudes avec celui de B. schlagalii, en particulier, l'incapacité totale de métaboliser les sucres. Nous reprendrons ce point lors de la discussion sur la position taxonomique de cette espèce.

1.5.2. Sources d'azote

L'ammonium, l'urée et l'asparagine peuvent servir de sources d'azote mais ni le nitrite ni le nitrate. L'azote moléculaire n'est pas fixé en conditions microaérophiles (1 % O₂).

1.5.3. Utilisation des composés réduits du soufre

Le thiosulfate peut être utilisé comme source alternative d'électrons et d'énergie mais la croissance est faible. Comme pour les Hydrogenobacter, nous relevons la possibilité d'une croissance mixolithoautotrophe avec utilisation simultanée de l'hydrogène et de composés réduits du soufre. Ces points font actuellement l'objet de recherches dans notre laboratoire.

1.6. Caractéristiques biochimiques

Les nitrates sont réduits en nitrites sans qu'il y ait formation d'azote gazeux. Une croissance anaérobie avec le nitrate comme accepteur d'électrons n'a pas été observée.

L'activité de la catalase et de l'oxydase est faible mais positive.

La croissance est inhibée par 1 % NaCl mais pas par 1 % glycine.

La concentration minimale inhibitrice de pénicilline G est de 0.04 U/ml; à des concentrations plus élevées, la croissance intervient après un certain délai suite à l'inactivation de l'antibiotique à la chaleur (Schenk et Aragno 1979).

L'amidon et la caséine ne sont pas hydrolysées; il n'y a pas de production d'indole dans un milieu riche en tryptophane.

La croissance n'est pas inhibée par l'adjonction de 3 g/l de borate; à 4.5 g/l elle est ralentie alors qu'à 10 g/l elle est complètement inhibée. B.schlegelii et B.acidocaldarius ont une sensibilité tout à fait comparable.

1.7. Enzymes de l'autotrophie

L'hydrogénase est localisée dans la fraction soluble, aucune activité n'est décelable dans la fraction membranaire (Tableau 28). Malgré cette localisation cytoplasmique, aucune réduction du NADH ou du NADPH a pu être mesurée. On a là un échéma inhabituel puisque, classiquement, les hydrogénases solubles sont à même de réduire les nucléotides (Schneider et Schlegel 1977). Une possible localisation périplasmique est susceptible d'expliquer ces résultats.

L'hydrogénase est inductible et ne peut être détectée sur des cellules cultivées en conditions hétérotrophes avec le butyrate comme source de carbone.

La ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase est active dans les cellules cultivées autotrophiquement avec une activité de 0.36 U/ml indiquant la présence d'un cycle de Calvin fonctionnel.

1.8. Lipides

Alore que la plupart des Bacillus possèdent de manière prédominante des acides gras ramifiés, on a mis en évidence chez les thermoacidophiles deux autres types de lipides qualitativement et quantitativement très importants: des hopanoïdes et des acides gras w-alicycliques (Derland et Brock 1971, Röhmer et al. 1979, Hipchen et al. 1981). Ces derniers ont également été détectés chez une bactérie corynéforme mésophile, Curtobacterium pusillum (Suzuki et al. 1981) où leur présence semble corrélée à une résistance au zinc (Ohya et al. 1986a,b).

Les hopanoïdes et les acides gras w-alicycliques, généralement des w-cyclohexane, sont efficaces pour condenser les membranes et diminuer leur perméabilité (Kannenberg et al. 1984, Poralla et al. 1984). Leur présence chez des organismes thermoacidophiles pour qui la probléma de la perméabilité membranaire se pose de façon cruciale est donc tout à fait intéressante et de fait, à l'exception de B. coagulans, on trouve l'un ou/et l'autre de ces lipides chez tous les Bacillus thermoacidophiles étudiés (Hipchen et al. 1981, Poralla et al. 1984).

Nous avons donc jugé important d'analyser les lipides des souches étudiées afin de voir si cette règle "générale" était suivie.

L'analyse faite par le Prof. Poralla a donné les résultats suivants:

- 8 composants lipidiques soit: 2 pigments (jaunâtres)
- 2 phospholipides,
 - phosphatidyléthénolamine
- 4 composants non identifiés

Donc, pas d'hopanoïdes ni de squalènes.

L'analyse des acides gras est donnée dans le Tableau 29. Il est à relever que la teneur en lipides de ces organismes est faible, environ 3 % contra 5 à 10 % en général.

1.9. Caractérisation génétique

Le pourcentage guanines + cytosines des sept souches étudiées est compris entre 57.5 et 57.9 %.

Le Tableau 30 donne les pourcentages d'hybridation entre les souches.

1.10. Position taxonomique

Les dendrogrammes de la Figure 22 montrant l'homogénéité du groupe des bactéries étudiées. Nous pouvons donc considérer qu'elles appartiennent à une seule et même espèce. Leurs caractéristiques satisfont à la description du genre Bacillus telle qu'elle est donnée par Claus et Barkelay (1986), c'est à dire bâtonnets à flagellation latérale, aérobies et formant une endospore par cellule.

Le seul Bacillus autotrophe valablement décrit jusqu'ici était B.schlegelii (Schenk et Aragno 1979). Dans le Tableau 31, nous en donnons les caractéristiques principales avec en regard celles des souches T2 et T201. Vu la forme de ses spores et ses optimums de température et de pH, nous avons également pris en considération, dans cette comparaison, B.acidocaldarius (Darland et Brock 1971). Les caractéristiques d'autres Bacillus thermoacidophiles, isolés de sources chaudes du Japon, y sont également indiquées (Uchino et Doi 1967). Bien que la caractérisation de ces derniers soit assez réduite, il apparaît assez nettement qu'ils s'apparentent à B.acidocaldarius.

L'originalité des souches T2 et T201, mise en exergue par cette comparaison, est corroborée par leur faible homologie ADN-ADN avec les deux espèces de Bacillus considérées:

T2 - B.schlegelii 0 %

T2 - B.acidocaldarius 17 %

Une affinité avec d'autres Bacillus, tels que: B.steartothermophilus (Donk 1920), B.thermoruber (Guicciardi et al. 1968, Aragozzini et al. 1976), B.coagulans (Hammer 1915), peut être écartée sur la base des pourcentages G + C, des capacités lithotrophes et de la possibilité d'utiliser des sucres comme source de carbone.

Sur la base de ces résultats, nous avons proposé la création d'une nouvelle espèce: Bacillus tuscise (Bonjour et Aragno 1984).

1.11. Description de l'espèce

Bacillus tuscise sp.nov. tus.cis.e, L.gen.n, de Tuscia; les romains désignaient par Tuscia la région d'Italie centrale où vivaient les étrusques et où a été isolé l'organisme étudié.

Bâtonnets, 0.8 x 4-5 µm avec un flagelle latéral, endospores subterminales, ovales, déformantes, 1.2 x 1.8 µm. Gram positif dans les cultures jeunes.

Colonise blanc-crème, crayeuses, s'étalent. En culture liquide, il se forme une pellicule blanchâtre. Un pigment jaune, hydrosoluble avec un pic d'absorption à 410 nm est produit dans des cultures autotrophes denses.

Parois cellulaires de type Gram positif sans protéines de surface.

Formation de PHB.

Auxotrophe. Métabolisme de type respiratoire, uniquement avec l'oxygène comme accepteur d'électrons. Pas de croissance anaérobie avec le nitrate. Nitrate réduit en nitrite.

Chimioolithotrophe avec l'hydrogène et les composés réduits du soufre comme source d'électrons et le CO₂ comme source de carbone ou chimiohétérotrophe.

Quelques composés organiques peuvent servir de source de carbone. Les sucres ne sont pas métabolisés. L'ammonium, l'urée et l'asparagine peuvent servir de sources d'azote. L'azote moléculaire n'est pas fixé en conditions microaérophiles. L'hydrogénase est inductible, soluble; les pyridines

nucléotides ne sont pas réduites. Le CO_2 est fixé par le cycle de Calvin.

Oxydase positive, catalase faiblement positive. L'amidon n'est pas hydrolysé. Pas de croissance en présence de 1 % NaCl.

Croissance possible en présence de 1 % glycine. Inhibition de la croissance par la pénicilline (0.04 U/ml).

Température optimale, environ 55°C; pas de croissance à 35°C et 65°C. pH optimal: 4.2 à 4.8; faible croissance à pH 3.5 et 6.0.

Pourcentage G + C : 57-58 %

Isolés de mares acides de la solfatare de San Federico (province de Grosseto, Italie).

Souche type: La souche T2 a été choisie comme souche type (DSM 2912). La description de la souche est la même que celle de l'espèce avec les additions suivantes: croissance en conditions hétérotrophes avec acétate, butyrate, α -cétoglutarate, malate, malonate, oxaloacétate, succinate, L-glutamate, isoleucine, valine, butanol, éthanol, phénol et propenol. Pourcentage G + C : 57.7 % (Bonjour et Aragno 1984).

2. Bacillus echlegelii

En 1977, Aragno (1978) isolait du sédiment du Loclat (petit lac holomictique près de Saint-Blaise, Neuchâtel, CH) une hydrogénobactérie sporulante, autotrophe. Cette bactérie étudiée par Schenk et Aragno (1979) a été décrite sous le nom de Bacillus echlegelii. Ses caractéristiques principales sont les suivantes:

- Bactérie sporulante à Gram variable, $0.6 \times 2.5-5 \mu\text{m}$ (photo 14)
- Spores rondes, déformantes, terminales, $0.8-1 \mu\text{m}$ de diamètre
- Chimioolithotrophe utilisant l'hydrogène comme source d'énergie et d'électrons ou chimiohétérotrophe sur un nombre limité de substrats organiques.

- Température optimale: - 70°C

- Pourcentage G + C: 67-68 %

Il s'agit donc d'une bactérie thermophile et cela malgré son origine.

Différents essais ont permis de constater que B.schlegelii pouvait être répétitivement isolé de sédiments de lac (couche oxydée). Il a également pu être isolé de la glace de la zone frontale d'un glacier (Steingletscher, canton de Berne, CH), mais est absent dans les sols ou les sédiments marins (Bonjour et al. 1987).

Dès lors se pose avec acuité le problème de l'écologie de cette bactérie; deux hypothèses peuvent être envisagées:

1) Origine autochtone

En dépit des faibles températures des sédiments lacustres, B.schlegelii pourrait s'y développer même si, en laboratoire (et donc en milieu synthétique), il n'y a pas de croissance en dessous de 37°C.

2) Origine allochtone

B.schlegelii pourrait ne se trouver dans ces milieux froids que sous forme de spores, les cellules végétatives se développant dans des milieux plus favorables (températures plus élevées). Le transport se ferait par voie aérienne, les spores s'accumulant alors dans les milieux dont les conditions physicochimiques favorisent la survie.

Les expériences ci-dessous ont pour but de trancher entre ces deux hypothèses.

2.1. Isolement de *B. schlegelii* de milieux à basse température

B. schlegelii a été initialement isolé de sédiments du Loclat. Des prélèvements effectués dans d'autres lacs ou dans des rivières ont montré que dans ce type d'environnement, il était généralement possible d'isoler cette bactérie.

Il n'est par contre pas possible d'isoler cet organisme à partir de sols cultivés ou forestiers ou de sédiments marins (Borgna 1982).

Des souches de *B. schlegelii* ont pu être isolées à partir de glace prélevée dans la langue du glacier de Steingletscher (Berne). Un kg d'échantillon de glace a été fondu puis filtré sur membrane de cellulose (Millipore, 0.45 μ m). Les membranes sont utilisées comme inoculum pour des cultures d'enrichissement effectuées en milieu liquide, en conditions autotrophes à 65°C. 3 des 5 échantillons prélevés ont permis la croissance de *B. schlegelii*.

Des tentatives d'isolement ont également été faites à partir de l'air. Nous avons utilisé une trappe à pollen (Burkard, Rickmansworth, GB); les poussières, spores, grains de pollen sont collectés sur une bande plastifiée recouverte de vaseline. Les particules trappées sur chaque bande correspondent à ≈ 300 m³ d'air. Les bandes sont mises en culture dans les mêmes conditions que ci-dessus. L'une d'elles a donné une croissance positive et permis d'isoler la souche R2 (Tableau 32 et photo 14).

2.2. Incubation de sédiment lacustre à basse température

De nombreux essais de culture à basse température ont été effectués en laboratoire dans des milieux synthétiques. Quelles que soient la durée et les conditions d'incubation, aucune croissance n'était possible en dessous de 40°C (Borgna 1982).

Il était cependant loisible de supposer que, dans son environnement "naturel", B. schlegelii ait d'autres optima de croissance (bien qu'à notre connaissance, aucune situation de ce genre n'ait été rapportée).

Pour étudier cette possibilité, nous avons tenté de suivre l'évolution de la population de B. schlegelii dans du sédiment incubé à basse température. Nous avons utilisé 5 l de sédiment, provenant du Loclat, prélevé dans la couche superficielle. Dans ce sédiment, nous savions trouver cette bactérie puisque c'est de là que la souche a été originellement isolée (Aragno 1978) et que les nombreuses expériences d'enrichissement effectuées ultérieurement ont toujours été positives. Ce sédiment a été soigneusement homogénéisé puis déposé, en couche de 10 cm, dans des cylindres en plastique et recouvert d'une hauteur d'eau égale. Les cylindres sont alors incubés à 8°C pendant huit mois. La température d'incubation a été choisie en fonction des relevés de température effectués dans le Loclat (Aragno 1981). Au cours des premiers mois, le nombre de cellules viables (MPN) diminue lentement puis il tend à se stabiliser. Aucun signe de croissance n'a été détecté.

2.3. Isolements à partir de milieux géothermaux

Parmi les souches isolées des milieux géothermaux décrites dans le chapitre IV, certaines possédaient des spores rondes terminales. Elles sont indiquées dans le Tableau 32.

La souche T2-11 (Italie) a été isolée de la boue d'une petite mare de la solfatare de San Federigo dont le niveau était très variable. Cette mare semblait en liaison avec un "soufflard" contigu. Son niveau d'eau était maximal quand le soufflard était en activité; quand celle-ci diminuait, le mare s'asséchait rapidement. L'échantillon a été prélevé une fois la mare vidée.

La souche G3 (Irlande) a été isolée d'un petit ruisseau alcalin (pH 9.4). La température au lieu d'échantillonnage était de 55°C.

Les souches He3a et He3b (Islande) proviennent de cendres volcaniques, parcourues par des fumerolles, prélevées au sommet de L'Eldföll, volcan apparu en 1973.

Ces quatre souches, ainsi que la souche R2, ont été caractérisées plus en détail.

2.3.1. Caractérisation phéno et génotypique

Les tests ont été choisis de façon à permettre une comparaison avec Bacillus schlegelii, souche type (DSM 2000); ils ne constituent pas une caractérisation exhaustive.

La liste des substances carbonées utilisables comme source de carbone et d'énergie est donnée dans le Tableau 33 avec d'autres caractéristiques phénotypiques et le pourcentage G + C.

Les substances suivantes n'ont pas permis la croissance: arabinose, cellobiose, fructose, maltose, rhamnose, saccharose, sorbose, tréhalose, xylose, benzate, citrate, formate, D gluconate, malonate, mesaconate, D(-) L(+) et mésotartrate, L-arginine, D-aspartate, glycine, L-tryptophane, L-valine, butanol, éthanol, glycérol, méthanol, mannitol.

Le Tableau 34 donne les résultats des hybridations ADN-ADN.

Toutes les souches isolées partagent de nombreux caractères phénotypiques. Par ailleurs, les homologies ADN-ADN élevées (> 80 %) montrent clairement qu'elles doivent appartenir à une seule et même espèce, voir aussi les dendrogrammes de la Figure 23.

Indépendamment de leur origine, toutes les souches appartiennent donc à l'espèce Bacillus schlegelii.

B) DISCUSSION

1. "Ecologie" de Bacillus tusciae

Les souches de Bacillus tusciae ont été isolées de milieux modérément chaude, moins de 60°C, et acides. Ces deux paramètres montrant par ailleurs d'importantes variations consécutives à des modifications du niveau d'eau. Ces milieux sont en outre pauvres en matière organique (voir chapitre IV).

Dans de tels environnements, la survie passe par un métabolisme autotrophe ce qui est bien le cas des organismes isolés.

L'existence de formes de résistance permet en plus à ces bactéries de survivre quand les conditions deviennent par trop défavorables: températures s'abaissant au-dessous de 40°C ou pH descendant plus bas que 3.

Dans ces milieux, les Hydrogenobacter sont bien entendu incapables de se développer et leur absence n'a rien d'étonnant; tout au plus aurions-nous pu nous attendre à isoler plus d'organismes du type Bacillus mais là, une fois de plus, la pression sélective très forte explique peut-être que seul un nombre minimal d'espèces puissent s'adapter; n'oublions pas non plus que les conditions d'enrichissement amplifient encore cette pression.

De fait, les caractéristiques de B. tusciae (thermophilie, acidophilie, possibilité de sporuler) traduisent une adaptation optimale à ce type d'environnement.

Toutes les tentatives d'isolement de cette bactérie dans d'autres milieux se sont révélées négatives. C'est le cas p.ex. pour tous les isolements tentés à partir de milieux froids.

Par ces essais, nous avons tenté de savoir si les spores de ce Bacillus étaient susceptibles d'être transportées sur de grandes distances pour s'accumuler dans des milieux favorables à leur

conservation. Les résultats négatifs obtenus ne nous permettent certes pas d'écarter définitivement cette hypothèse, mais il faut cependant supposer que ce transport ne doit être ni intense ni fréquent puisque toutes les tentatives d'isolement dans ces milieux froids se sont soldées par des échecs.

2. "Ecologie" de Bacillus schlegelii

Bacillus schlegelii se trouve dans trois types d'environnements:

- Environnements avec des températures basses et constantes et une humidité permanente telle que les sédiments lacustres et les glaciers.
- Air
- Environnements géothermaux et volcaniques avec peut-être une préférence pour les milieux aux conditions physicochimiques peu stables (cendres dans des zones de fumerolles, mares au niveau variable) qui demande à être vérifiée.

Sur la base de ces données, nous pouvons raisonnablement postuler que B. schlegelii a l'écologie suivante:

Croissance et multiplication ont lieu dans des environnements chauds tels que les sources géothermales et volcaniques. Cela correspond à ses propriétés physiologiques déterminées en laboratoire, soit surtout: thermophilie et utilisation préférentielle de l'hydrogène comme source d'énergie et d'électrons.

La possibilité de sporuler permet à la bactérie de résister aux variations de température consécutives essentiellement à des variations du niveau d'eau. Les spores permettent la dispersion de l'espèce sur de longues distances.

L'isolement de la souche R2 à partir de l'air suggère que le transport se fait par anémochorie. Les spores ainsi transportées vont être déposées au hasard. Si elles tombent dans un milieu assurant leur survie, elles vont s'y accumuler. Les conditions idéales de conservation des spores semblent être une humidité constante et une température basse et stable. Les sols, exposés à de trop fréquentes variations de ces deux paramètres, ne permettent pas, à long terme, la conservation des spores.

La dispersion des spores supprime les conséquences de l'isolement géographique des différents habitats. Nous avons vu (chapitre VB) que l'isolement géographique pouvait avoir d'importantes répercussions sur la spéciation bactérienne et entraîner des divergences génotypiques entre des organismes par ailleurs totalement indiscernables. Les hautes homologues ADN-ADN obtenues entre les différentes souches de B. schlegelii étudiées ici montrent clairement que ce phénomène de spéciation géographique n'intervient pas si les bactéries disposent d'un moyen de dispersion.

3. Quelques remarques sur la thermophilie des Bacillus

Nous avons, au début de ce chapitre, suggéré l'hypothèse de l'existence de deux groupes distincts de Bacillus thermophiles:

- Le groupe des "opportunistes" regroupant p.ex: B. stearothermophilus, B. licheniformis, B. coagulans (groupe 1).
- Le groupe des "thermophiles vrais" avec p.ex: B. schlegelii, B. tusciae, B. acidocaldarius (groupe 2).

Les résultats obtenus dans ce chapitre nous permettent de présenter quelques arguments étayant cette hypothèse, les faits les plus intéressants étant surtout d'ordre écologique.

Le Tableau 35 donne le domaine de température permettant la croissance de quelques Bacillus thermophiles.

Nous constatons que les Bacillus du 2^{ème} groupe se développent à des températures supérieures à 50°C, valeurs rarement atteintes dans les sols tempérés mais typiques des zones géothermales. D'autre part, il s'agit d'organismes sténothermes, incapables de se développer à température ambiante.

Les Bacillus du 1^{er} groupe se développent par contre généralement à des températures inférieures à 50°C, températures pouvant être atteintes dans des sols chauffés par le soleil; de plus, leur caractère eurythermal traduit une adaptation à un milieu exposé à de grandes variations de température. B. steierthermophilus présente des caractéristiques intermédiaires, il serait par conséquent intéressant d'essayer de l'isoler d'aïres géothermales.

Les Bacillus du groupe des "opportunistes" sont fréquemment isolés de sols des régions tempérées où, nous l'avons vu, les conditions de température leur sont tout à fait favorables. Les Bacillus du deuxième groupe ne sont par contre jamais isolés de tels milieux. Les écarts importants de température brisent probablement la dormance des spores sans pour autant atteindre des valeurs permettant une vie végétative. Dans ces conditions, il n'y a donc ni survie ni développement possibles. On isolera plutôt ces organismes de milieux où les températures sont basses et constantes et l'humidité élevée, conditions assurant la viabilité des spores sur de longues périodes, ou alors dans des milieux à hautes températures.

On peut s'interroger sur la phylogénie de ces deux groupes de Bacillus. Nous avons jusqu'ici considéré la thermophilie comme un caractère primitif, témoin d'une évolution qui aurait débuté à haute température. Dans le cas des Bacillus "opportunistes", il paraît plus probable qu'il s'agisse d'une adaptation secondaire; adaptation qui leur aurait permis de tirer parti des élévations transitoires de température fréquentes dans leur habitat naturel. Ceci expliquerait le succès des expériences de thermoadaptation réalisées avec ces espèces-là!

Nous sommes conscients que cette hypothèse manque encore d'arguments pour être crédible, mais nous espérons que ces quelques éléments de réflexion ouvriront la porte à de nouvelles recherches.

VII CONCLUSIONS

" Regarde avec un oeil, regarde avec l'autre puis vois avec les deux yeux".

N. Mailer (1983)

Un des attraits principal des organismes thermophiles est leur adaptation aux processus biotechnologiques.

En effet, de nombreuses réactions d'importance biotechnologique ont des rendements plus élevés à haute température. Une élévation de la température entraîne une augmentation du taux de diffusion et de la solubilité de la plupart des composés non gazeux; elle diminue la viscosité et la tension superficielle de l'eau ce qui a généralement un effet positif sur la catalyse enzymatique. Autre avantage non négligeable, les risques de contamination sont moins grands qu'en conditions mésophiles.

La réalisation des fermentations microbiennes à haute température présente aussi des avantages. Les activités métaboliques engendrent une production de chaleur et le refroidissement des cuves de réaction consomme beaucoup d'énergie. Les fermentations thermophiles ne nécessitant pas un refroidissement aussi intensif, il y a gain d'énergie (Brock 1986).

Le potentiel biotechnologique des organismes thermophiles ou des enzymes thermostables qui en sont extraits est donc conséquent et a déjà trouvé de nombreuses applications: production d'éthanol, digestion anaérobie thermophile des déchets, "leaching" microbien pour ne citer que quelques exemples.

Dans un premier temps, l'intérêt s'est surtout porté sur l'utilisation de mutants thermophiles. Assez rapidement cependant, les chercheurs se sont intéressés aux organismes isolés d'environnements géothermiques ou volcaniques. Si l'utilisation industrielle des organismes isolés dans de tels environnements n'est pas toujours immédiate, leur étude soulève par contre de passionnantes questions théoriques: quelle est l'origine de ces organismes, leur position taxonomique, quelles sont les caractéristiques biochimiques sous-tendant leur thermophilie etc.?

Une des retombées les plus spectaculaires de ces investigations a été la découverte d'un troisième règne, celui des Archéobactéries (Woese et Fox 1977, Woese et al. 1978). Parmi les bactéries thermophiles isolées, une majorité appartient en effet à ce règne, spécialement si les isollements se font dans l'extrémité supérieure de la gamme de température.

Autre élément ayant stimulé l'étude de la vie à haute température, la découverte des environnements hydrothermaux sous-marins (travaux de Baross et Stetter, principalement). Nous avons déjà relevé le renouveau apporté aux théories évolutives suite à cette découverte, en fait c'est tout un champ d'idées nouvelles et d'applications inédites qui sont impliqués par la mise en évidence de ce nouveau type de biotopes.

Ainsi, aiguillonnée par le double intérêt de la recherche appliquée et fondamentale, l'investigation des milieux à haute température est actuellement extrêmement intensive. Par conséquent, il y a eu multiplication des descriptions d'organismes thermophiles ou de processus biotechnologiques se déroulant à haute température. Pourtant, malgré cet engouement, peu de questions fondamentales ont reçu une réponse. Ainsi, l'écologie, la biochimie et l'évolution des organismes thermophiles restent-ils encore bien mystérieux.

S'il en est ainsi, c'est peut-être parce que les recherches entreprises sont souvent trop "pointues" et qu'il est encore trop tôt pour pouvoir faire une synthèse des multiples renseignements glanés.

Tenant compte de cela, nous nous sommes efforcées, dans ce travail, de privilégier une approche plus globale.

Notre sujet, défini dans l'introduction, était l'étude des hydrogénobactéries isolées de milieux géothermaux. Pour rester fidèle à cette optique "large" de départ, nous avons étudié simultanément plusieurs types différents d'hydrogénobactéries thermophiles; de plus, nous avons inclus dans cette étude une description aussi détaillée que possible des habitats de ces bactéries.

Un tel élargissement de notre champ d'investigation nous a contraint à ne traiter plusieurs problèmes que d'une façon superficielle. Nous estimons cependant qu'une telle démarche a le mérite de soulever les "vrais" problèmes. Il est toujours temps d'approfondir cette approche dans une seconde étape.

Les principaux résultats de cette étude peuvent être sommairement résumés comme suit:

Les milieux géothermaux apparaissent comme des environnements originaux dont de nombreuses caractéristiques, outre leur température, ont des répercussions sur la physiologie des bactéries qui y vivent. Dans de tels milieux, vu la pauvreté en matière organique, les producteurs primaires sont des bactéries lithoautotrophes. Etant donné leur abondance, l'hydrogène et les composés réduits du soufre constituent de bonnes sources d'électrons et d'énergie. L'hétérotrophie et, conséquemment, la mixotrophie y apparaissent comme des métabolismes de moindre importance.

De ces milieux, nous avons pu isoler deux types d'hydrogénobactéries thermophiles (si nous n'écrivons pas "seulement", c'est parce que nous considérons que la liste est loin d'être close!).

Tout d'abord, les organismes appartenant au genre Hydrogenobacter. Ce sont les premières hydrogénotrophes obligatoires décrites; ils présentent en outre la possibilité, écologiquement très intéressante, de pouvoir utiliser conjointement l'hydrogène et les composés réduits du soufre. Autres originalités: la fixation du CO₂ par un mécanisme différant du cycle de Calvin et leur hétérogénéité génotypique liée (peut-être) à un mécanisme de spéciation géographique. La position de ce genre est intrigante et son élucidation fait actuellement l'objet de recherches menées en collaboration avec le Prof. Stackebrandt.

Autre type d'hydrogénobactéries thermophiles isolé, les Bacillus hydrogénotrophes. On les isole de milieux où les conditions de température et d'humidité sont variables et donc l'existence de formes de résistance indispensable à la survie. Nous avons mis en évidence que, dans certains cas, les spores de ces bactéries peuvent être dispersées sur de longues distances. Ce phénomène explique l'isolement d'organismes thermophiles sporulants de milieux "froids". Remarquons que les seuls Bacillus autotrophes valablement décrits sont des thermophiles.

Comme de bien entendu, les résultats obtenus ont soulevés plus de questions qu'ils n'ont apporté de réponses. A notre avis, les points suivants doivent être prioritairement élucidés:

- Importance relative des deux types de lithotrophie chez les Hydrogenobacter, soit: utilisation de l'hydrogène et des composés réduits du soufre.

Pour cela, nous proposons de réaliser des enrichissements en conditions lithotrophes avec le thiosulfate comme source d'énergie et d'électrons, puis, sur les organismes

sulfoxydants ainsi isolés, de tester la possibilité d'une croissance hydrogénotrophe. Il est également possible d'envisager des enrichissements où les deux sources d'énergie et d'électrons sont présentes, soit séquentiellement, soit simultanément. Dans ce contexte, il conviendrait de reprendre les essais de quantification des hydrogénobactéries des milieux géothermaux en conditions mixolithotrophes.

- Explication de l'autotrophie obligatoire de ce genre et tentatives d'isolement de souches facultativement autotrophes, de type Hydrogenobacter, similaires à MF3.

A notre avis, les deux questions sont liées et c'est la comparaison entre autotrophes facultatifs et obligatoires appartenant à une même espèce qui nous permettra le plus facilement de comprendre les causes de l'autotrophie obligatoire. Nous avons déjà, au point 1.6 du chapitre VB, proposé quelques méthodes d'enrichissement d'autotrophes facultatifs; il conviendrait ensuite d'effectuer une étude enzymatique détaillée des souches isolées en se penchant plus spécialement sur l'activité et la régulation de l' α -cétoglutarate déshydrogénase.

- Recherche de caractères phénotypiques permettant de distinguer les différentes espèces dont la définition n'est actuellement basée que sur des divergences génotypiques.

Une spéciation basée sur des critères d'homologies ADN-ADN représente une situation insatisfaisante tant sur le plan formel que pratique. Des différences entre les diverses espèces pourraient p.ex. être recherchées au niveau du spectre de protéines, de la composition en lipides, de la présence d'antigènes spécifiques etc.

- Mécanismes de spéciation intervenant dans les environnements géothermaux.

Pour vérifier notre hypothèse d'une spéciation géographique, il est nécessaire d'isoler des Hydrogenobacter d'autres régions du monde, p.ex. de Nouvelle Zélande ou des Etats-Unis (Yellow Stone). Une telle recherche implique une collaboration entre chercheurs de façon à pouvoir obtenir des échantillons sans être contraint d'aller les récolter sur place. Dans un deuxième temps, cette problématique devrait être étendue à d'autres genres de bactéries isolées d'environnements géographiquement distants, en commençant peut-être par les Thermus.

- Position taxonomique du genre Hydrogenobacter.

Nous l'avons dit, ce problème fait actuellement l'objet d'une collaboration entre notre laboratoire et celui du Prof. Steckebandt. Du résultat des analyses d'ARN 16S dépendront les recherches complémentaires à entreprendre.

- Recherche de nouvelles hydrogénobactéries n'appartenant ni au genre Hydrogenobacter, ni au genre Bacillus.

De telles bactéries existent peut-être, mais les conditions d'enrichissement devront peut-être être modifiées pour pouvoir les isoler. Il conviendrait en tout premier lieu de réduire la pression partielle d'oxygène à laquelle les organismes sont soumis lors des enrichissements et des cultures subséquentes.

- Etude "in situ" de la population bactérienne des milieux étudiés.

Dans une première étape, une observation au microscope d'échantillons d'eau serait intéressante. Ultérieurement il serait souhaitable de mettre incuber des lames en verre directement dans les eaux étudiées puis de les observer en contraste de phase.

Divers points laissés en suspens dans ce travail devraient également être résolus:

- Localisation de l'hydrogénase de Bacillus tusciae.

Nous avons suggéré une localisation péripasémique de cet enzyme (chapitre VIA, point 1.7). Il conviendrait de vérifier cette hypothèse en mesurant l'activité de l'hydrogénase dans des protoplastes.

- Etude du pigment hydrosoluble jaune produit par Bacillus tusciae.
- Tolérance au borate des organismes thermophiles, voir chapitre VA, point 11.2.

Nous espérons vivement que ces quelques suggestions, la liste est loin d'être exhaustive, pourront être utiles à tous ceux qui désireraient poursuivre des recherches plus avant dans cette voie.

VIII BIBLIOGRAPHIE

- Achenbach-Richter L, Gupta R, Stetter KO, Woese CR (1987) Where
the original eubacteria thermophiles? *System Appl Microbiol*
9:34-39
- Alfredsson GA, Ingason A, Kristjansson JK (1986) Growth of
thermophilic obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacteria
on thiosulfate. *Letts Appl Microbiol* 2:21-24
- Allan MB (1953) The thermophilic aerobic sporeforming bacteria.
Bacteriol Rev 17:125-173
- Allgood GS, Perry JJ (1985) Oxygen defense systems in obligately
thermophilic bacteria. *Can J Microbiol* 31:1006-1010
- Amelunxen RE, Linn M (1968) Comparative thermostability of
enzymes from Bacillus stearothermophilus and Bacillus cereus.
Arch Biochem Biophys 125:765-769
- Amelunxen RE, Murdock AL (1978) Mechanisms of thermophily. CRC
Critical Reviews in Microbiology 6:343-393
- Andersen K (1979) Mutations altering the catalytic activity of a
plant type ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in
Alcaligenes autrophus. *Biochim Biophys Acta* 585:1-11
- Aragno M (1978) Enrichment, isolation and preliminary
characterisation of a thermophilic, endospore forming hydrogen
bacterium. *FEMS Microbiol Lett* 3:13-1

Aragno M (1981) Response of microorganisms to temperature. In: Lenge OL, Nobel PS, Omond CB, Ziegler H (eds) Encyclopedie of plant physiology, N Ser 12A. Physiological plant ecology I. Springer, Berlin Heidelberg, pp 339-369

Aragno M, Schlegel HG (1981) The hydrogen-oxidizing bacteria. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria, vol 1. Springer, Berlin Heidelberg New-York, pp 865-893

Aragno M, Walther-Meuschat A, Mayer F, Schlegel HG (1977) Micromorphology of Gram-negative hydrogen bacteria. 1. Cell morphology and flagellation. Arch Microbiol 114:93-100

Aragozzini F, Truppino P, Manachini PL, Craveri R (1976) Fatty acid composition of Bacillus thermoruber. Ann Microbiol Enzimol 26:9-13

Arnorsson S, Gunnlaugsson E (1985) New gas geothermometers for geothermal exploration - Calibration and application. Geochim Cosmochim Acta 49:1307-1325

Arrhenius S (1927) Die thermophilen Bakterien und der Strahlungsdruck der Sonne. Z Physik Chem 130:516-519

Baross JA, Damming JW (1983) Growth of "black smoker" bacteria at temperatures of at least 250°C. Nature 303:423-426

Baross JA, Hoffman SE (1985) Submarine hydrothermal vents and associated gradient environments as sites for the origin and evolution of life. Origins of Life 15:327-345

Baross JA, Lilley MD and Gordon LI (1982) Is the CH₄, H₂ and CO venting from submarine hydrothermal systems produced by thermophilic bacteria? Nature 298:366-368

- Bertholomew JW, Paik G (1966) Isolation and identification of obligate thermophilic sporeforming bacilli from ocean basin cores. J Bacteriol 92:635-638
- Bartholomew JW, Rittenberg SC (1949) Thermophilic bacteria from deep ocean bottom cores. J Bacteriol 57:658
- Belay N, Sperling R, Daniele L (1984) Dinitrogen fixation by a thermophilic methanogenic bacterium. Nature 312:286-288
- Beudecker RF, Gottschal JC, Kuenen JG (1982) Reactivity versus flexibility in thiobacilli. Antoine van Leeuwenhoek 48:39-51
- Bonjour F, Aragno M (1984) Bacillus tuecieae, a new species of thermoacidophilic, facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen oxidizing sporeformer from a geothermal area. Arch Microbiol 139:397-401
- Bonjour F, Aragno M (1986) Growth of thermophilic obligatorily chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacteria related to Hydrogenobacter with thiosulfate and elemental sulfur as electron and energy source. FEMS Microbiol Lett 35: 11-15
- Bonjour F, Graber A, Aragno M (1987) Isolation of Bacillus schlegelii a thermophilic hydrogen oxidizing, aerobic autotroph, from geothermal and non-geothermal environments. Microb Ecol 16: (In Press)
- Borgne A (1982) Contribution à l'étude écologique d'une hydrogénobactérie thermophile: Bacillus schlegelii. Travail de licence, Université Neuchâtel
- Borichawski RM, Umbreit WW (1966) Growth of Thiobacillus thiooxidans on glucose. Arch Biochem Biophys 116:97-102
- Bowlen B, Schlegel HG (1981) Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. Annu Rev Microbiol 35:405-452

Brock TD (1967) Life at high temperature. Science 158:1012-1019

Brock TD (1969) Microbial growth under extreme conditions.
Symposium of the society of general microbiology 19:15-41

Brock TD (1978) Thermophilic microorganisms and life at high temperature. Springer, Berlin Heidelberg New-York.

Brock TD (1986) Introduction: an overview of the thermophiles.
In: Brock TD (ed) The thermophiles, general, molecular and applied microbiology, chap 1. Wiley series in ecological and applied microbiology, Mitchell R (ed). New-York Chichester Brisbane Toronto Singapore, pp 1-16

Brock TD, Derland GK (1970) Limits of microbial existence: temperature and pH. Science 169:1316-1318

Broda E (1970) The evolution of bioenergetic processes. Prog Biophys Mol Biol 21:143-208

Butler RG, Umbreit WW (1966) Absorption and utilization of organic matter by the strict autotroph, Thiobacillus thiooxidans, with special reference to aspartic acid. J Bact 91:661-666

Cashion P, Holder-Franklin MA, McCully J, Franklin M (1977) A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. Anal Biochem 81:461-466

Castenholz RW (1969) Thermophilic blue-green algae and the thermal environment. Bacteriol Rev 33:476-504

Castenholz RW (1979) Evolution and ecology of thermophilic microorganisms. In: Shilo M (ed) Strategies of microbial life in extreme environment. Dahlem Konferenzen, Berlin, pp 373-392

Charles AM, Suzuki I (1966a) Mechanism of thiosulfate oxidation by Thiobacillus novellus. Biochim Biophys Acta 128:510-521

Charles AM, Suzuki I (1966b) Purification and properties of sulfite: cytochrome c oxidoreductase from Thiobacillus novellus. Biochim Biophys Acta 128:522-534

Childress J, Felbeck H, Somero G (1987) Des symbioses en mer profonde. Pour la Science 117:57-63

Clark C, Schmidt EL (1967) Growth response of Nitrosomonas europaea to amino acids. J Bact 93:1302-1308

Claude D, Berkeley RCW (1986) The genus Bacillus. In: Sneath PHA (ed) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2. Williams & Williams, Baltimore, pp 1105-1135

Cohn F (1862) Ueber die Algen des Karlsbader Sprudels, mit Rücksicht auf die Bildung des Sprudelsinters. Abhandlungen Schles Ges Vater Cultur Breslau, Abt. Naturwiss Med 2:35-55

Conrad R, Aragno M, Seiler W (1983a) The inability of hydrogen bacteria to utilize atmospheric hydrogen is due to threshold and affinity for hydrogen. FEMS Microbiol Lett 18:207-210

Conrad R, Aragno M, Seiler W (1983b) Production and consumption of hydrogen in a eutrophic lake. Appl Environ Microbiol 45:502-510

Conrad R, Bonjour F, Aragno M (1985a) Aerobic and anaerobic microbial consumption of hydrogen in geothermal spring water. FEMS Microbiol Lett 29:201-205

Conrad R, Phelps TJ, Zeikus JG (1985b) Gas metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. Appl Environ Microbiol 50:595-601

Conrad R, Seiler W (1979) The role of hydrogen bacteria during the decomposition of hydrogen by soil. FEMS Microbiol Lett 6:143-145

- Conrad R, Seiler W (1982) Utilization of traces of carbon monoxide by aerobic oligotrophic microorganisms in ocean, lake and soils. Arch Microbiol 132:41-46
- Creig H (1953) The geochemistry of the stable carbon isotopes. Geochim Cosmochim Acta 3:53-92
- D'Amore F, Celetti R, Ferrara GC, Panichi C (1977) Secondary changes in the chemical and isotopic composition of the geothermal fluids in Larderello field. Geothermics 5:153-163
- D'Amore F, Nuti S (1977) Notes on the chemistry of geothermal gases. Geothermics 6:39-45
- D'Amore F, Truesdell A (1984) Helium in the Larderello geothermal fluid. Geothermics 13:227-239
- Derland G, Brock TD (1971) Bacillus acidocaldarius sp. nov.; an acidophilic spore-forming bacterium. J Gen Microbiol 67:9-15
- Davis DH, Doudoroff M, Stanier RY, Mandel M (1969) Proposal to reject the genus Hydrogenomonas: Taxonomic implications. Int J Syst Bacteriol 19:375-390
- De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. Eur J Biochem 12:133-142
- Delwiche CC, Finstein MS (1965) Carbon and energy sources for the nitrifying autotroph Nitrobacter. J Bact 9:102-107
- Dixon RDD (1972) Hydrogenase in legume root nodules bacteroids: occurrence and properties. Arch Mikrobiol 85:193-201
- Donk PJ (1920) A highly resistant thermophilic organism. J Bacteriol 5:373-374

Dugnani L, Wyrech I, Gandolla M, Aragno M (1986) Biological oxidation of hydrogen in soils flushed with a mixture of H_2 , CO_2 , O_2 and N_2 . FEMS Microbiol Ecol 38:347-351

Egorova AA, Deryugina ZP (1963) The spore-forming thermophilic thiobacterium Thiobacillus thermophila Imchenetskii nov.spec. Mikrobiologiya 32:439-446

Emnova EE, Zavarzin GA (1977) Additional characteristics of a thermophilic hydrogen bacterium Hydrogenomonas thermophilus. Mikrobiologiya 46:405-408

Ernst WG (1983) The early earth and the archaean rock record. In: Schopf JW (ed) Earth's Earliest Biosphere. Princeton University, pp 41-52

Evans MCW, Buchanan BB, Arnon DJ (1966) A new ferredoxin dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. Proc natl Acad Sci USA 55:928-934

Farrel J, Campell LL (1969) Thermophilic bacteria and bacteriophages. Adv Microbiol Physiol 3:83-108

Farrel J, Rose AH (1967) Temperature effects on microorganisms. In: Rose AH (ed) Thermobiology. Academic Press, New-York, pp 147-218

Fasnacht M (1987) Etude physiologique de la mixotrophie chez l'hydrogénobactérie Aquaspirillum autotrophicum. Thèse, Université Neuchâtel

Fox GE, Pechman KR, Woese CR (1977) Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. Int J Syst Microbiol 27:44-57

Fox GE, Stackebrandt E, Heepell RB, Gibone J, Maniloff J, Oyer TA, Wolfe RS, Belch WE, Tanner R, Magrum L, Zablen LB, Blakemore R, Gupta R, Bonnsen L, Lewis BJ, Stahl DA, Luehreen KR, Chen KN, Woese CR (1980) The phylogeny of procaryotes. Science 209:457-463

Friedrich CG, Mitrenga G (1981) Oxidation of thio sulfate by Paracoccus denitrificans and other hydrogen bacteria. FEMS Microbiol Lett 10:209-212

Fuchs G (1986) CO₂ fixation in acetogenic bacteria: variation on a theme. FEMS Microbiol Rev 39:181-213

Fuchs G, Stupperich E, Eden G (1980b) Autotrophic CO₂ fixation in Chlorobium limicola. Evidence for the operation of a reductive tricarboxylic acid cycle in growing cells. Arch Microbiol 128:64-71

Fuchs G, Stupperich E, Jaenchen R (1980a) Autotrophic CO₂ fixation in Chlorobium limicola. Evidence against the operation of the Calvin cycle in growing cells. Arch Microbiol 128:56-63

Galimov EM, Teplinsky GI, Tabassaranskiy ZA, Gavrilov EYE (1973) On the conditions of formation of gas deposits in the eastern part of Turan Plate as revealed by the carbon isotopic composition of the gases. Geokhimiya 11:1689-1703

Gandolla M, Dugnani L, Leoni R (1986) Valutazione dei processi chimici e biologici in uno scarico controllato per un corretto approccio alla progettazione e gestione. Ingegneria Ambientale 15:426-448

Gandolla M, Grebner E (1983) Proposte per future ottimizzazioni di discariche controllate. Wasser Energie Luft 75:163-182

Gandolla M, Grebner E, Leoni R (1982) Ergebnisse von Lydimetern auf der Deponie Croglio, Schweiz. Veröffentlichung der Stadtbautechnischen Univ Braunschweig 33:163-182

Glauser M, Gandolla M, Aragno M (1987) Anaerobic digestion of urban wastes: sewage sludge and organic fraction of garbage. In: Wise D (ed) Bioenvironmental Systems, vol 3. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 143-225

Goto E, Kodama T, Minoda Y (1977) Isolation and culture conditions of thermophilic hydrogen bacteria. Agric Biol Chem 41:685-690

Goto E, Kodama T, Minoda Y (1978) Growth and taxonomy of thermophilic hydrogen bacteria. Agric Biol Chem 42:1305-1308

Gottschal JC, Kuenen JG (1980a) Mixotrophic growth of Thiobacillus A₂ on acetate and thiosulfate as growth limiting substrates in the chemostat. Arch Microbiol 126:33-42

Gottschal JC, Kuenen JG (1980b) Selective enrichment of facultatively chemolithotrophic thiobacilli and related organisms in continuous culture. FEMS Microbiol Lett 7:241-247

Grohmann G (1924) Zur Kenntnis Wasserstoff oxydierender Bakterien. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abt 2. 61:256-271

Guicciardi A, Biffi MR, Manachini PL, Craveri A, Scolastico C, Rindone B, Craveri R (1968) Ricerche preliminari su un nuovo schizomicete termofilo del genere Bacillus e caratterizzazione del pigmento rosso prodotto. Ann Microbiol Enzimol 18:191-205

Gunter BD (1978) C₁ - C₄ hydrocarbons in hydrothermal gases. Geochim Cosmochim Acta 42:137

Gunter BD, Muegrave BC (1966) Gas chromatographic measurements of hydrothermal emanations at Yellowstone National Park. Geochim Cosmochim Acta 30:1175-1189

Hammer (1915) Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk. Iowa Agr Exp Sta Res Bull 19:119-131

- Haystead A, Robinson R, Stewart WDP (1970) Nitrogenase activity in extracts of heterocystous blue-green algae. Arch Microbiol 75:235-243
- Hede GD, Madigan MT (1986) Utilization of aminoacids and lack of diazotrophy in the thermophilic anoxygenic phototroph Chloroflexus aurantiacus. J Gen Microbiol 132:2469-2473
- Heinen W, Lauwers AW (1981) Growth of bacteria at 100°C and beyond. Arch Microbiol 129:127-128
- Hempfling WP, Vishniac W (1967) Yield coefficients of Thiobacillus neopolitaneus in continuous culture. J Bact 93:874-878
- Hipchen B, Röhl A, Poralla K (1981) Occurrence in soil of thermophilic bacilli possessing w-cyclohexane fatty acids and hopanoids. Arch Microbiol 129:53-55
- Holding AJ, Collee JG (1971) Routine biochemical test. In: Norris JR, Ribbons DW (eds) Methods in microbiology, vol 6A. Acad Press, London New-York, pp 1-32
- Holo H, Sirevag R (1986) Autotrophic growth and CO₂ fixation of Chloroflexus aurantiacus. Arch Microbiol 145:173-180
- Hubert R, Langworthy TA, König H, Thomm M, Woese CR, Sleytr UB, Stetter KO (1986) Thermotoga maritima sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. Arch Microbiol 144:324-333
- Hulston JR, McCabe WJ (1962a) Mass spectrometer measurements in the thermal areas of New Zealand. Part 1. Carbon dioxide and residual gas analysis. Geochim Cosmochim Acta 26:383-397
- Hulston JR, McCabe WJ (1962b) Mass spectrometer measurements in the thermal areas of New Zealand. Part 2. Carbon isotopic ratios. Geochim Cosmochim Acta 26:399-410

IJSB (1984) Calderobacterium hydrogenophilum validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside IJSB. List n° 14. 34:270-271

Imshenetskiy A, Solnzeva L (1945) The growth of aerobic thermophilic bacteria. J Bacteriol 49:539-546

Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat 44:226-270

Jansen K, Fuchs G, Thauer RK (1985) Autotrophic CO₂ fixation by Desulfovibrio baareii: a demonstration of enzyme activities characteristic for the acetyl CoA pathway. FEMS Microbiol Lett 28:311-315

Jansen K, Thauer RK, Widdel F, Fuchs G (1984) Carbon assimilation pathways in sulfate reducing bacteria. Formate, carbon dioxide, carbon monoxide, and acetate assimilation by Desulfovibrio baareii. Arch Microbiol 138:257-262

Jenni B, Aragno M, Wiegand JKW (1987) Numerical analysis and DNA-DNA reassociation studies on Xanthobacter and emendation of Xanthobacter flavus. Syst Appl Microbiol 9:247-253

Johnson EJ, Abraham S (1969) Assimilation and metabolism of exogenous organic compounds by the strict autotrophic Thiobacillus thioautotrophicus and Thiobacillus neapolitanus. J Bact 97:1198-1208

Kegeler T (1982) Isolation and purification of ribose-5-phosphate kinase from Nicotiana glutinosa. In: Edelman et al (eds) Methods in Chloroplast Molecular Biology, chap 55. Elsevier Biomedical Press, pp 695-705

Kämpf C, Pfennig N (1980) Capacity of Chromatiaceae for chemotrophic growth. Specific respiration rates of Thiocystis violacea and Chromatium vinosum. Arch Microbiol 127:125-137

- Kandler O, Statter KO (1981) Evidence for autotrophic CO₂ assimilation of Sulfolobus brierleyi via a reductive carboxylic acid pathway. Zbl Bakt Myg; I Abt Orig C27, pp 111-121
- Kang KS, Veader GT, Mirasoul PJ, Cottrall IW (1982) Agar-like polysaccharide produced by a Pseudomonas species: production and basic properties. Appl Environ Microbiol 43:1086-1091
- Kannenbarg E, Blume A, Poralla K (1984) Properties of ω -cyclohexane fatty acids in membranes. FEBS 172:331-334
- Kaplan RW (1978) Der Ursprung des Lebens: Biogenetik, eine Forschungsgebiet heutiger Naturwissenschaft, 2 überarb Auflag. Thieme Stuttgart.
- Kawasumi JK, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y (1984) Hydrogenobacter thermophilus gen.nov., sp.nov., an extremely thermophilic, aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium. Int J Syst Bacteriol 34:5-10
- Kelly DP (1966) Fluoroacetate toxicity in Thiobacillus naapolitanus and its relevance to the problem of obligate chemoautotrophy. Arch Mikrobiol 61:59-76
- Kelly DP (1967) The incorporation of acetate by the chemoautotroph Thiobacillus naapolitanus strain C. Arch Mikrobiol 56:99-116
- Kelly OP (1982) Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur. Phil Trans R Soc Lond B 298:499-528
- Kita I, Matsuo S, Wakita K (1982) H₂ generation by reaction between H₂O and crushed rock: An experimental study on H₂ degassing from the active fault zone. Journal of Geophysical Research 87:10789-10795
- Klug MJ, Markovetz AJ (1967) Thermophilic bacterium isolated on n-tetradecane. Nature 215:1082-1083

Kneuth LP, Epstein S (1976) Hydrogen and oxygen ratios in nodular and bedded cherts. *Geochim Cosmochim Acta* 40:1095-1108

Koffler H (1957) Protoplasmic differences between mesophiles and thermophiles. *Bacteriol Rev* 21:227-240

Koffler H, Gele GO (1957) The relative thermostability of cytoplasmic proteins from thermophilic bacteria. *Arch Biochem Biophys* 67:249-251

Kogut M (1980) Are there strategies of microbial adaptation to extreme environments? *TIBS* 5:15-18

Kristjansson SK, Ingason A, Alfredsson GA (1985) Isolation of thermophilic autotrophic hydrogen-oxidizing bacteria, similar to Hydrogenobacter thermophilus, from Icelandic hot springs. *Arch Microbiol* 140:321-325

Kryukov VR, Savel'eva ND, Pusheva MA (1983) Calderobacterium hydrogenophilum gen. et sp. nov., an extremely thermophilic hydrogen bacterium and its hydrogenase activity. *Mikrobiologiya* 52:761-768

Kuenen JG, Gottchal JC (1982) Competition among chemolithotrophs and methylotrophs and their interactions with heterotrophic bacteria. In Bull AT, Stater JH (eds) *Microbial interactions and communities*, vol 1. Academic Press, New-York, pp 153-187

Kuenen JG, Robertson LA (1984) Interaction between obligately and facultatively chemolithotrophic sulfur bacteria. In: *Continuous culture, biotechnology, medicine and the environment* chap 9. Chichester, pp 139-158

Langworthy TA, Pond JL (1986) Membranes and lipids of thermophiles In: Brock TD (ed) *The thermophiles, general, molecular and applied microbiology* chap 5. Wiley series in ecological and applied microbiology, Mitchell R (ed). New-York Chisester Brisbane Toronto Singapore, pp 107-135

- Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Selliger HPR, Clark WA (1975) International code of nomenclature of bacteria. ASM, Washington ed.
- Lickfield KG (1976) Transmission electron microscopy of bacteria. In: Norrie JR, Ribbons DW (eds) Methods in microbiology, vol 9. Acad Press, London New-York, pp 127-176
- Lin CC, Casida LE Jr (1984) Gelrite as a gelling agent in media for the growth of thermophilic microorganisms. Appl Environ Microbiol 47:427-429
- Ljungdahl LG, Sharod D (1976) Proteins from thermophilic microorganisms. In: Heinrich MR (ed) Extreme environments, mechanism of microbial adaptation. Academic Press, New-York, pp 147-187
- London J, Rittenberg SC (1964) Path of sulfur in sulfide and thiosulfate oxidation by thiobacilli. Proc natl Acad Sci USA 52:1183-1190
- Madigan MT (1986) Chromatium tepidum, sp.nov., a thermophilic photosynthetic bacterium of the family Chromatiaceae. Int J Syst Bacteriol 36:222-227
- Maillet M (1983) Nuits des temps. Laffont R (ed), Paris.
- Maire N (1983) Contribution à l'étude de la biomasse bactérienne des sols et de son activité par des méthodes biologiques globales. Thèse, EPFL
- Margulis L (1972) Early cellular evolution. In: Ponnampetuma C (ed) Exobiology, frontiers of biology, vol 23. North Holland Monographs, Amsterdam, pp 342-358
- Marmur J, Doty P (1952) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J Mol Biol 5:109-118

- Metin A (1978) Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 32:433-468
- Mc Gee JM, Brown LR, Tiecher RG (1967) A high temperature hydrogen oxidizing - Hydrogenomonas thermophilus, n.sp. *Nature* 214:715-716
- Melton CE, Gierdini AA (1974a) The composition and significance of gas released from natural diamonds from Africa and Brazil. *Am Min* 59:775-782
- Melton CE, Gierdini AA (1974b) Experimental result and a theoretical interpretation of gaseous inclusions found in Arkansean natural diamonds. *Am Min* 60:413-417
- Miquel F (1888) Monographie d'un bacille vivant au-delà de 70°C. *Ann Micrographie* 1:3-10
- Norgerd MV, Bertell PF (1976) An accelerated spectrophotometric micro-procedure for the analysis of DNA-DNA hybridization in free solution. *Gilford Res Reviews* 3:1-5
- Norrie JR, Swein H (1971) Staining bacteria. In: Norris JR, Ribbons DW (eds) *Methods in microbiology*, vol 5A. Academic Press, London New-York, pp 105-134
- Nuti S (1964) Elementary and isotopic compositions of noble gases in geothermal fluids of Tuscany, Italy. *Geothermics* 13:215-226
- Nuti S, Noto F, Ferrara GC (1980) The system $H_2O - CO_2 - CH_4 - H_2$ at Trevele, Italy: Tentative interpretation. *Geothermics* 9:287-295
- Ohya H, Komai Y, Yamaguchi M (1986a) Occurrence of Curtobacterium sp. possessing ω -cyclohexyl fatty acids in soil with zinc added. *Arch Microbiol* 145:9-12

Ohya H, Komai Y, Yemeguchi M (1986b) Zinc tolerance of an isolated bacterium containing w-cyclohexyl fatty acid. FEMS Microbiol Lett 34:257-260

Owen RJ, Hill LR (1979) The estimation of base composition, base pairing and genome sizes of bacterial deoxyribonucleic acids. Tech Ser Soc Appl Bacteriol 14:277-296

Pan P, Umbreit WW (1972) Growth of obligate autotrophic bacteria on glucose in a continuous flow-through apparatus. J Bact 109:1149-1155

Panichi C, Celati R, Noto P, Squarci P, Taffi L, Tongiorgi E (1974) Oxygen and hydrogen isotopes studies of the Larderello (Italy) geothermal system. In: Techniques in Groundwater Hydrology, vol 2. IAEA Vienne, pp 3-28

Panichi C, Gonfietini R (1978) Environmental isotopes in geothermal studies. Geothermics 6:143-161

Panichi C, Tongiorgi E (1976) Carbon isotope composition of CO₂ from springs, fumaroles, mofettes and travertines of central and southern Italy: a preliminary prospecting method of geothermal areas. Proc 2nd UN Symp Develop Use Geothermal Resources, San Francisco, 1:815-825

Peck HO (1960) Adenosine 5'-phosphosulfate as an intermediate in the oxidation of thiosulfate by Thiobacillus thioparus. Proc natn Acad Sci USA 46:1053-1057

Peck HD, Stulberg MP (1962) O₂ studies on the mechanism of sulfate formation and phosphorylation in extracts of Thiobacillus thioparus. J Biol Chem 237:1648-1652

Plinius Secundus, Caius (1944) Natural history. Harvard Univ Press, Cambridge.

Porsilla K, Härtner T, Kannenberg E (1984) Effect of temperature and pH on the hopanoid content of Bacillus acidocaldarius. FEMS Microbiol Lett 23:253-256

Postgate JR (1972) The acetylene reduction test for nitrogen fixation. In: Norris JR, Ribbons DW (eds) Methods Microbiol, vol 6B. Academic Press, London New-York, pp 343-356

Postgate JR (1982) The fundamentals of nitrogen fixation . Cambridge University Press.

Reed LJ, Murkherjee BB (1969) α -Ketoglutarate dehydrogenase complex from Escherichia coli. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) Methods in enzymology, vol XIII (Lowenstein JM ed) Citric acid cycle. Academic Press, London New-York, pp 55-61

Rittenberg SC (1969) The roles of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria. Adv Microb Phys 3:159-196

Rittenberg SC (1972) The obligate autotroph - the demise of a concept. Antoine van Leeuwenhoek 38:457-478

Röhmer M, Bouvier P, Ourisson G (1979) Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. Proc natl Acad Sci USA 76:847-851

Savil'eva ND, Kryukov VR, Pusheva MA (1982) An obligate thermophilic hydrogen bacterium. Mikrobiologiya 51:765-769

Schauder R, Widdel F, Fuchs G (1987) Carbon assimilation pathways in sulfate-reducing bacteria. II. Enzymes of a reductive citric acid cycle in the autotrophic Desulfobacter hydrogenophilus. Arch Microbiol 148:218-225

Schenk A, Aragno M (1979) Bacillus schlegelii, a new species of thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium oxidizing molecular hydrogen. J Gen Microbiol 115:333-341

Schilliger A (1898) Ueber die thermophile Bakterien. Hyg Rundschau 8:568-570

Schink B, Lupton FS, Zeikus JG (1983) Radioassay for hydrogenase activity in viable cells and documentation of aerobic hydrogen-consuming bacteria living in extramembranous environments. Appl Environ Microbiol 45:1491-1500

Schlegel HG (1975) Mechanisms of chemo-autotrophy. In: Kinne O (ed) Marine ecology, vol 2, part 1. Wiley, New-York, pp 9-60

Schlegel HG (1986) Inorganic donors: aerobic chemolithotrophic bacteria. In: General microbiology, 6th edition, chap 11. Cambridge University Press, pp 352-368

Schmidt K, Lisanen-Jensen S, Schlegel HG (1963) Die Carotinoide der Thiorhodaceen. Arch Mikrobiol 46:117-126

Schneider K, Schlegel HG (1977) Localization and stability of hydrogenase from aerobic hydrogen bacteria. Arch Microbiol 112:229-238

Schubert KR, Evans HJ (1976) Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc natl Acad Sci USA 73:1207-1211

Schweizer C, Aragno M (1975) Etude des hydrogénobactéries dans un petit lac (Le Loclat ou lac de Saint Blas). Bull Soc Neuchâtel Sci Nat 98:79-87

Seegerer A, Neumer A, Kristjansson JK, Stetter KO (1986) Acidianus infernus gen.nov., sp.nov., and Acidianus brierleyi comb.nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing Archaeobacteria. Int J Syst Bacteriol 35:559-564

Seiler W (1978) The influence of the biosphere on the atmospheric CO and H₂ cycles. In: Krumbein WE (ed) Environmental biochemistry and geomicrobiology, vol 3. Ann Arbor Science Publ, Ann Arbor Michigan, pp 773-810

Seiler W, Giehl H, Roggendorf P (1980) Detection of carbon monoxide and hydrogen by conversion of mercury oxide to mercury vapor. Atmos Technol 12:40-45

Shiba H, Kawasumi T, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y (1982) The deficient carbohydrate metabolic pathways and the incomplete tricarboxylic acid cycle in an obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium. Agric Biol Chem 46:2341-2345

Shiba H, Kawasumi T, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y (1984) Effect of organic compounds on the growth of an obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium, Hydrogenobacter thermophilus TK-6. Agric Biol Chem 48:2809-2813

Shiba H, Kawasumi T, Igarashi Y, Kodama T, Minoda Y (1985) The CO₂ assimilation via the reductive tricarboxylic acid cycle in an obligately autotrophic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium, Hydrogenobacter thermophilus. Arch Microbiol 141:198-203

Siebert K, Schobert P, Bowlen P (1981) Purification, some catalytic and molecular properties of phosphoribulokinase from Alcaligenes eutrophus. Biochem Biophys Acta 658:35-44

Silver M, Kelly DP (1976) Rhodanese from Thiobacillus A2: catalysis of reaction of thiosulfate with dihydrolipoate and dihydrolipoamine. J Gen Microbiol 97:277-284

Sinenky M (1974) Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in Escherichia coli. Proc natl Acad Sci USA 71:522-525

Sleytr OW, Glauert AM (1976) Ultrastructure of the cell wall of two closely related Clostridia that possess different regular arrays of surface subunits. J Bacteriol 126:869-882

Smith AJ, Hoare DS (1968) Acetate assimilation by Nitrobacter agilis in relation to its obligate autotrophy. J Bacteriol 95:844-855

Smith AJ, Hoare DS (1977) Specialist phototrophs, lithotrophs, and methylotrophs: a unity among a diversity of prokaryotes? Bacteriol Rev 41:419-448

Smith AL, Kelly DP, Wood AP (1980) Metabolism of Thiobacillus A2 grown under autotrophic mixotrophic and heterotrophic conditions in chemostat culture. J Gen Microbiol 121:127-138

Smith AJ, London J, Stanier RY (1967) Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. J Bact 94:972-983

Sneath PHA (1957) Some thoughts on bacterial classification. J Gen Microbiol 17:184-200

Soness S, Panisset M (1980) Introduction à la nouvelle bactériologie. Presses de l'université de Montréal, Montréal et Masson, Paris.

Stackebrandt E, Ludwig W, Weizenegger M, Dorn S, Mc Gill TJ, Fox GE, Woese CR, Schubert W, Schleiffer RH (1987) Comparative 16S RNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. J Gen Microbiol 133:2523-2529

Stackebrandt E, Woese CR (1979) A phylogenetic dissection of the family Micrococcaceae Current Microbiol 2:317-321

- Steneh J (1976) Information transfer in thermophilic bacteria. In: Heinrich MR (ed) Extreme environments, mechanisms of microbial adaptation. Academic Press, New-York, pp 85-101
- Stetter KO (1982) Ultrathin mycelia-forming organisms from submarine volcanics areas having an optimum growth temperature of 105°C. Nature 300:258-260
- Stetter KO, König H, Stackebrandt E (1983) Pyrodictium gen.nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. Syst Appl Microbiol 4:535-551
- Stevens SE Jr, Metita VB, Lane LS (1985) Heterocyst development and nitrogen fixation by Mastigocladus laminosus. In: Ludden PW, Burris JE (eds) Nitrogen fixation and CO₂ metabolism. Elsevier, New-York, pp 235-243
- Sundaram TK (1986) Physiology and growth of thermophilic bacteria. In: Brock TD (ed) The thermophiles, general, molecular and applied microbiology, chap 4. Wiley series in ecological and applied microbiology, Mitchell R (ed). New-York Chichester Brisbane Toronto Singapore, pp 75-106
- Suzuki K, Seito K, Kawaguchi A, Okuda S, Komagata K (1981) Occurrence of ω-cyclohexyl fatty acids in Curtobacterium pusillum strains. J Gen Appl Microbiol 27:261-266
- Timmerman-Hoor A (1976) Energetic aspects of the metabolism of reduced sulphur compounds in Thiobacillus denitrificans. Antonie van Leeuwenhoek 42:483-492
- Trent JD, Chastain RA, Yayanos AA (1984) Possible artefactual basis for apparent bacterial growth at 250°C. Nature 307:737-740
- Trüding PA (1969) Assimilatory and dissimilatory metabolism of inorganic sulphur compounds by micro-organisms. Adv Microb Physiol 3:111-158

Trüper HG (1964) CO₂-Fixierung und Intermediärstoffwechsel bei Chrometium okenii Farty. Arch Mikrobiol 49:23-50

Tuttle JH, Jannasch HW (1972) Occurrence and types of Thiobacillus-like bacteria in the sea. Limnol Oceanogr 17:532-543

Uchino F, Doi S (1967) Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. Agric Biol Chem 31:817-822

Uratsu SL, Kysner HH, Weber DF, Lim ST (1982) Hydrogen uptake (HUP) activity of Rhizobium japonicum from major U.S. soybean production areas. Crop Sci 22:600-602

Urey HC (1952) On the early chemical history of the earth and the origin of life. Geophysics 38:351-363

Uzamae Y (1965) Chemical investigations of hot springs in Japan. Tsukiji Shokan, Tokyo.

Vishniac W (1971) Limits of microbial productivity in the ocean. Symp Soc Gen Microbiol 21:355-366

Wallhäuser KH, Schmidt H (1967) Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, . Chemotherapie. Thieme, Stuttgart.

Walther-Maurer A, Aragno M, Mayer F, Schlegel HG (1977) Micromorphology of Gram-negative hydrogen bacteria. II. Cell envelope, membranes, and cytoplasmic inclusions. Arch Microbiol 114:101-110

Waring GA (1965) Thermal springs of the United States and other countries of the world. A summary. Revised by Blankenship RR and Bentell R. Geological survey professional paper 492. US Govt Print Off. Washington.

White DE (1957) Thermal waters of volcanic origins. Bulletin of the geological society of America, vol 68, pp 1637-1658

Whittenbury R, Kelly DP (1977) Autotrophy: a conceptual phoenix. In: Haddock BA, Hamilton WA (eds) Microbial energetics 27th symposium of the society for general microbiology, imperial collage London. Cambridge University Press, Cambridge, pp 121-149

Williams RAD (1975) Caldoactive and thermophilic bacteria and their thermostable proteins. Sci Prog Oxf 62:373-393

Williams RAD, Hoare DS (1972) Physiology of a new facultatively autotrophic thermophilic Thiobacillus. J Gen Microbiol 70:555-566

Winograsky S (1887) Ueber Schwefelbakterien. Bot Ztg 45:489-600, 606-616

Winograsky S (1888) Ueber Eisenbakterien. Bot Ztg 46:261-276

Winograsky S (1922) Eisenbakterien als Anoxydanten. Zentbl Bakt Parasitkde, II 57:1-21

Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. Proc natl Acad Sci USA 74:5088-5090

Woese CR, Magrum LJ, Fox GE (1978) Archaeobacteria. J Molec Evol 11:245-252

Woese CR, Weisburg WG, Hahn CM, Paeter BJ, Zablen LB, Lewis BJ, Macke TJ, Ludwig W, Stackebrandt E (1985) The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. System Appl Microbiol 6:25-33

Wolin MJ, Miller TL (1982) Interspecies hydrogen transfer: 15 years later. ASM News 48:561-565

Wood HG, Ragedale SW, Pezacks E (1986a) The acetyl CoA pathway: a newly discovered pathway of autotrophic growth. TIBS 11:14-18

Wood HG, Ragsdale SW, Pezacka S (1986b) The acetyl CoA pathway of autotrophic growth. FEMS Microbiol Rev 39:345-362

Zuber H (1979) Structure and fonction of enzymes from thermophilic microorganisms. In: Shilo M (ed) Strategies of microbial life in extreme environments. Dahlem Konferenzen, Berlin, pp 393-415

Annexe :
tableaux 1 - 35

Tableaux 1 à 9 :

Caractérisation physicochimique des sites de prélèvement de la région de Larderello (principalement, solfatare de San Federigo).

La position des sites étudiés (No 1 à 11) est repérée sur la Figure 4 et les photos 2 à 9.

TABLEAU 1

Caractéristiques des sites de prélèvement

Site(1)	Description	Oct. 82 Temp.	Oct. 82 pH	Déc. Temp.	82 pH	Oct. Temp.	83 pH	Sept. Temp.	84 pH
1.1	eau bouillonnante gouille ~2m	98,7	6			95,5	6,7	93	6,9 photo 2
1.2	exutoire de 1.1 à ~50 cm de la source					85	7,0	84	7,0
1.3	exutoire de 1.1 à ~2 m de la source	70,2	6,2-6,5	70	5,5-6	70,2	7,2	70,6	6,95
1.4	exutoire de 1.1 à ~3 m de la source	65,3	6,2-6,5						
1.5	exutoire de 1.1 à ~5 m de la source	60,7	6,2-6,5						
2	bord ouest du complexe principal					85	2,6	69,7	2,8 photo 3
3	bord nord du complexe principal					73,6	2,1	64,2	2,8 photo 3
4	bord est du complexe principal					78	6,4	76,4	5,6 photo 5
5	grande mare 8-10 m	85	4,5						
6	chaudron à boue					83	3,1	82,2	3,4 photo 4
7	mare avec boues grises					98	5,8	98	4,5 photo 6
8	idem					60	2,0	61	2,8 photo 7
9a	petite source près d'une décharge					39	2,2	37,3	2,1 photo 7
9b	effluent de 9a faible débit					98,5	6	93,3	6,3
10	étang da Lago					55-60	4,5	55-60	5,5
						86	6		photo 9

TABLEAU 1 (suite)

Site(1)	Description	Oct. 82 Temp. pH	Déc. 82 Temp. pH	Oct. 83 Temp. pH	Sept. 84 Temp. pH
11	petite mare 3-4 m forme en entonnoir	42	2-2,5	34,1	2,2
Q	pied d'un coffone gouille peu profonde				
12	fontaine de Bagnelo	44,5	6,5-7		
13	effluent de 12	43,5	neutre		
14	ruisselet près d'une fumeroles au-dessus de Monterotondo	70	neutre		
15	boue chaude près d'une fumeroles (Monterotondo)	?	?		
16	eol de fumeroles				
17	seu + sédiment à côté d'une fumeroles			85-90 2,5 60-70 5	
18	"algalmet" sur petite source au bord d'un chemin (Monterotondo)			45 5,5	
20	petite source avec émission gazeuse			25 5,5	
21	mare avec boue grises			45 4	

Temp. : température (°C)

(1) : voir aussi localisation sur la figure 4

* : les numéros de site seront repris sans autre spécification dans les tableaux suivants

* : étang asséché

TABLEAU 2

Description physicochimique des sites d'échantillonnage

Ions dissous (mg/l)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	II	III	IV	V	VI
HCO_3^-	3,25	3,75	4	2	15,2	0	1,75	6	38	0,8	32	0,3	0,000	0	0	0	1,9
NO_2^-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,03	0,000	0	0,00	-	-
NH_4^+	29,2	424,9	396,5	157	667,4	493,5	465,8	256,3	334,4	380,6	1052	0,1	3,1	1,0	5,4	-	-
SO_4^{2-}	315,6	2271	2219	1279	2600	3165	4320	2292	2400	2400	8500	178	602	501	189	5	41
Si^{2-}	20	0	1,5	0	7,7	0	0	0	0	0	0	2,35	32,94	2,45	0	-	-
PbA^{3+} (tot)	10,42	4,3	2,76	1,84	4,9	1,22	2,14	1,68	0,306	3,06	11	0,14	6,1	0,8	0,00	0,00	0,154
Ca^{2+}	126	138	134	323	245	790	217	108	533	493	533	2	64	272	1,140	6	34
Mg^{2+}	13	4,66	4,55	3,1	19,4	20,9	16	10,8	5,9	29,6	127,7	0,5	31	68	70	0	7,6
Na^+	30,9	3,43	3,62	2,59	12,74	8,89	12,59	17,57	5,36	8,29	82,9	156	22	129	7030	1,5	11
K^+	9,89	7,75	6,96	6,24	10,76	22,43	24,11	14,56	4,67	6	86,6	15	7,1	69	961	0,8	3,1
Fe^{2+}	nd	nd	nd	nd	0,98	nd	nd	nd	0,08	nd	nd	-	-	-	-	-	-
Fe (tot)	0,45	49,25	48,62	11,87	0,98	0,42	91	90	3,12	0,18	585	0,21	28	0,06	0,42	0,13	0,02
H_3BO_3	2014	244	195	54,8	256	198	530	854	61	2792	3170	3,88	325,47	24,55	29,12	-	0,086
As	2,75	2,75	1,5	0,75	0,55	0,15	3,75	1,45	0,092	1,00	nd	0,5	1,9	0,5	0,00	-	-
Cl^-	34	0	0	0	7	2	0	18	9	7	70	63	169	170	13,300	3,5	15
Mn^{2+}	0,08	0,8	0,76	1,8	2,62	3	1,01	1,2	0,8	0,93	13,5	0,00	0,3	0,03	1,9	0,0054	0,046
SiO_2	151,94	289,54	284,83	137,60	248,48	184,50	168,24	416,66	146,40	88,81	317,5	609	147	60	38	3,4	5,9
HCO_3^- (titr.)	64,0	nd	nd	3,05	nd	15,2	nd	nd	15,2	39,6	nd	112	0	667	192	12	101
pH	6,68	2,6	2,15	6,35	3,13	5,85	2,0	2,15	6	6	2,2	8,7	1,5	6,6	7,3	-	-
temp (°C)	95,5	85	73,6	78	83	98	60	39	98,5	86	34,1	90,5	69,9	72	57	110	110

100

23

eaux thermales

eaux thermales

eaux froides

eaux froides

TABLERAU 3Dosage minéralogique qualitatif

	4	5	6	9	11
pyrite	+	+	+	+	
quartz	+	+	+	+	+
muscovite	+	+	+	+	
phengite	+	+		+	
gypse	+	+		+	+
fluorapatite				+	
zoïste				+	
microcline					+

TABLERAU 4Quantification en % des minéraux

	4	5	6	9	11
quartz	47	33	46	65	29
pyrite	14	7	24	7	0.5
phyllosilicates	16	14	19	-	22
non dosé	23	46	11	29	48,5

TABLEAU 5

Analyse des Gaz (%)

Gaz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11
H ₂	3.580	3.558	4.364	4.508	4.082	3.481	3.781	4.253	3.838	4.578
O ₂	0.426	2.113	2.524	2.829	2.361	0.077	2.257	2.913	6.150	1.742
N ₂	7.879	14.236	13.186	12.737	17.944	5.956	18.473	20.967	22.296	19.707
CH ₄	0.693	1.041	1.178	1.262	1.322	0.617	1.176	3.194	1.187	1.626
CO ₂	86.145	75.161	76.834	77.403	73.870	83.335	73.467	71.566	63.750	72.278
H ₂ S	1.277	3.891	1.086	0.485	0.421	2.231	0.719	nd	3.579	0.169

nd : non détecté

TABLEAU 6

Analyse du carbone en % dans les échantillons lyophilisés

Site	1.1	1.2	1.3	2	3	4	5	6	7	8	9a	9b	10	11
%Corg	0.46	0.80	0.30	0.40	0.20	0.50	0.50	0.40	0.50	0.70	0.40	3.20	0.62	0.80

TABEAU 7

Concentration en hydrogène et oxygène dissous mesurée
dans des eaux géothermales

	9	5	a	b
O2 dissous (mg/l)	2.2	1.0		
H2 dissous (μ l/l)	0.2	50	0.2	0.86

TABEAU 8

Teux constant d'activité de consommation d'hydrogène dans des
eaux géothermales incubées à 60°C, avec ou sans oxygène (μ l H2/h)

	9	5	a	b
avec O2	1.9	9.7	5.4*	16.25*
sans O2	11.5	1.7		

a : Weshburn Pool B (Yellowstone) ; 82°C, pH 7 d'après Schink

b : Lemonade Pool (Yellowstone) ; 40°C, pH 2.5 et el. (1983)

* : Hydrogénase (μ l H2/h)

TABEAU 9

Estimation du nombre de germes (MPN) et de la teneur en ATP

1	2	3	4	5
1.1	1.1	N 75°C	250	?
1.2	1.2	N 75°C	25000	27.5
1.3	1.3	N 75°C	95000	19.2
2	2	A 75°C	0	126.7
3	3.1 (eau)	A 75°C	0	?
	3.2 (sédiment)	A 75°C	2500	nd
4	4.1	A 75°C	250	25.5
	4.2	N 75°C	250	
5	5.1 (eau)	A 75°C	0	0.6
	5.2 (sédiment)	A 75°C	0	nd
6	6.1	A 75°C	40	
	6.2	N 75°C	40	
7	7	A 55°C	2500	439.7
8	8	A 55°C	250	750
9a	9.1	A 75°C	0	5
	9.2	N 75°C	0	
9b	9.3	A 55°C	450000	24.1
	9.4	N 55°C	2000	
10	10.1	A 75°C	0	3.2
	10.2	N 75°C	0	
11	11.1 (eau)	A 55°C	1500	86.7
	11.2 (sédiment)	A 55°C	9500	

1 : numéro du site

2 : numéro de l'échantillon. Sans précision, il s'agit d'un mélange d'eau et de sédiment

3 : conditions de culture N : milieu minéral de base pH 7
A : milieu minéral de base pH 3.5

4 : MPN/100 ml (mg)

5 : concentration en ATP (ng/ml -mg-)

nd : non détecté

? : valeur aberrante

TABLÉAU 10

Enrichissements et isolements effectués dans la zone géothermale de Larderello

a	b	c	d	
1.1	98,7	6	T3	a : numéro de l'échantillon
1.2	84	7	+	b : température (°C) au moment de
1.3	70,2	6,2-6,5	T4	c : pH l'échantillonnage
1.4	63,3	6,2-6,5	T5	d : présence d'hydrogénobactéries,
1.5	60,7	6,2-6,5	-	éventuellement code de la souche
2	69,7	2,8 -	-	isolées; le symbole "b" ajouté
3	64,2	2,8	-	après le nom de code signifie que
4	76,4	5,6	P4	l'échantillon a été pasteurisé
5	82,2	3,4	-	avant d'être mis en culture
6	98	4,5	-	* : 201 } enrichissement en
7	61	2,8	-	201b } milieu neutre
8	37,3	2,1	-	202 } enrichissement en
9a	93,3	6,3	P9	202b } milieu acide
9b	55-60	4,5	+	
10	86	6	-	
11	42	2-2,5	T2	
	25	3,5	T22	
			T22b	
"Q"	92	7,01	P10	
12	44,5	6,5-6,7	-	
13	43,5	6,5-6,7	T12	
14	70	7	T14	
16	85-90	2	-	
17	60-70	5	T171	
18	45	5,5	T181	
20	25	5,5	T201*	
			T201b	
			T202	
			T202b	
21	45	4	T21	
			T21b	

TABLEAU 11

Liste des souches isolées ailleurs qu'à "Lerderello"

Site	Temp	pH	Souche isolée
Stufe de Nerone(1)	50°C	neutre	061*
Agnano(1)	50°C	neutre	081*
Agnano	50°C	neutre	091*
Agnano	60°C	neutre	102
Agnano	50°C	neutre	111*
Agnano	50°C	neutre	121*
Vesuve(2)	?	5-6	144
Etne(2)	?	?	MF3
Geysir(3)	55°C	9,4	G3
Lac Myvatn(3)	65°C	5,5	My4
Heimey(3)	?	?	He3
Kleppjernereykir(3)	80°C	8,8	Re3
Krisuvik(3)	50°C	6,6	K6
Hveragerdhi(3)	100°C	8,4	E3
	75°C	8,9	E8
	66,5°C	7,9	E9n
	64°C	5,5	E11

* : souches perdues ultérieurement

(1) Fig. 6

(2) Fig. 1

(3) Fig. 7

TABLEAU 12

Origine et % G + C des souches d'Hydrogenobacter étudiées

Souche	Site de prélèvement	% G + C	
T14	14	40.3	
T3	1.1	39.9	
T4	1.3	40.1	
F9	9a	39.9	
F10	Q	39.8	
F4	4	39.0	
T13	13	37.8	
MF3	Etna	38.6	
T5	1.4	37.8	
T171	17	38.1	
T181	18	37.7	
T191	19	38.4	
102	Agnano	38.1	
HvH27	Hveragerdi-Hengill et	37.6	
H-1	Borgerfjörður, Islande	38.5	38.6*
TK-6	Mine, Izu, Japon	38.3	43.7*
TK-H	Kan-nawa, Kyshu, Japon	38.0	43.7*
TK-G	Yufuin, Kyuehu, Japon	38.4	43.9*
Z-829	Uzon gayser, Kamtchatka, URSS	37.5	39-41*

TABLEAU 13

Pourcentage d'homologie ADN-ADN entre les diverses souches d'*Hydrogenobacter*

	T3	T4	P4	P9	P10	T5	T13	T171	T181	T191	102	HF3	HvH27	H-1	TK-6	TK-H	TK-0	Z-829
T3	100																	
T4	89	100																
P4	74		100															
P9			80	100														
P10		93	85		100													
T5						100												
T13	0	0					100											
T171								100										
T181			0				95		100									
T191										100								
102							96	83			100							
HF3	0					87	88	100	84	93	88	100						
HvH27													100					
H-1	0					0					0		86	100				
TK-6	14							0			0		15	100				
TK-H		10						0							86	100		
TK-0															92		100	
Z-829	0						0				0			8	15	13		100

TABLEAU 14

Caractérisation phénotypique des *Hydrogenobacter*

	T13	T3	TK-6	2-829	H-1
forme dimorphique	bâtonnets 0.3/4 (3-7)	bâtonnets 0.3/2.5 (2-4)	bâtonnets 0.3/4 (3-7) 0.3-0.5/2-3*	bâtonnets 0.25/2.5 (2-5) 0.35-0.5/2-8*	bâtonnets 0.3/4 (3-7) 0.4-0.5/3-4-6-7*
spores	-	-	-	-	-
flagelle	-	-	-	-	-
croissance en présence de :					
1% NaCl	-	-	-	-	-
1% glycine	-	-	-	-	-
cr. hétérotrophe	-	-	-	-	-
cr. lithotrophe	-	-	-	-	-
avec :					
S ₂ O	+	+	+	+	+
So	+	+	+	+	+
H ₂	+	+	+	+	+
cr. à 45°C	faible	-	faible	-	faible (-)*
80°C	-	-	faible (-)*	faible (-)*	-
temp. optimal	70 C	75 C	70-75 C*	74-76 C*	70 C*
source d'azote					
NH ₄	+	+	+	+	+
urée	+	+	+	+	+
asparagine	+	+	+	+	+
HO ₃	-	-	-	-	-
NO ₂	-	-	-	-	-
N ₂	-	-	-	-	-
pén. O	-	-	-	-	-
(M.I.C.) U/ml	0.0159	0.0318	0.0318	0.0159	0.0159
réd. anaérobie	-	-	-	-	-
des nitrates	-	-	-	-	-

TABLEAU 15

Essais de croissances de souches d'Hydrogenobacter, en conditions H₂-lithotrophes, sur milieu minéral solidifié avec gelrite

Concentration en gelrite (g/l)	Concentration en cation (g/l)	Allure du gel	Croissances
8	-	très mou	+
8	1g CaCl ₂	très mou	+
10	2g CaCl ₂	très mou	+
8	0.4g MgSO ₄ .7H ₂ O	solide	-
12	0.4g MgSO ₄ .7H ₂ O	solide	-

TABLEAU 16

Températures cardinales de croissances (°C) de souches d'Hydrogenobacter déterminées en conditions H₂-lithotrophes avec un incubateur à gradient de température

	Temp. min.	Temp. opt.	Temp. max.
P10	52	75	86
TK-6	45	70-75*	80*
Z-829	50	70*	80
H-1	50	74-76*	82*
T171	50	70	80

TABLEAU 17Tolérance au borate des Hydrogenobacter

DO finales obtenues, en fonction de la concentration en borate dans le milieu (résultats normalisés).

Borate (g/l)	<u>A.eutropbus</u>	H-I	TK-G	Z-829	T3	T171
0	1	1	1	1	1	1
3	0.024	0.62	0.82	1	1	0.79
5	-	0.16	0.56	0.68	0.16	0.63
10	-	0.01	0.02	0.06	0.013	0.08

TABLEAU 18
Résumé des caractéristiques de croissance de la souche T3
cultivée en conditions lithotrophes

Source(s) d'énergie et d'électrons	taux de croissance	activité hydrogénase	remarques
H ₂	0.3	1.85 U/mg	
Thiosulfate	?	0	croissance non exponentielle, accumulation transitoire de soufre.
H ₂ + Thio.	0.67 0.3	1.7 U/mg	courbe biphasique, valeurs de μ avant et après épuisement du thiosulfate

TABLEAU 19

Activité de l'hydrogénase à 50°C (U/mg) des Hydrogenobacter cultivés en conditions H₂-lithotrophes

Souche	activité Hase
T5	0.53
T13	0.98
T171	0.98
T181	0.79
MF3	0.96
T4	0.61
T191	0.66

TABLEAU 20

Localisation de l'hydrogénase

Souche	activité hydrogénasique (U/mg)		
	fraction totale	fraction soluble	fraction membranaire
MF3	0.52	0	1.67 (80%)
T3	1.78	0.11 (2.4%)	2.5 (85%)

TABLEAU 21

Activité de phosphoribulokinase (U/mg) chez les Hydrogenobacter cultivés en conditions H₂-lithotrophes

Souche	activité PRK
<u>Aquaspirillum autotrophicum</u>	1.04
MF3	0.0087
T171	0
H-I	0
T3	0.008
TK-6	0
Z-829	0

TABEAU 22

Caractéristiques des souches Z-809 et MF3

	Z-809(1)	MF3
Sources de carbone :		
acétate	+	+
butyrate	+	+
malate	+	+
pyruvate	+	+
succinate	+	+
alanine	+	+
arginine	+	-
asparagine	+	+
glutamate	+	+
phenylalanine	+	+
proline	+	+
cellobiose	-	+
fructose	-	+
glucose	-	+
maltose	-	+
mannose	-	+
saccharose	-	+
éthanol	-	+
glycérol	-	+
Sources d'azote :		
ammonium	+	+
urée	+	+
nitrate	+	-
nitrite	-	-
N ₂	-	-
optimum de :		
température	76°C	70°C
pH	7	7.4

(1) D'après Sevel'eve et al. (1982)

TABLEAU 23Rendement de croissance avec thiosulfate

Souche	(g/mole)
<u>Thiobacillus</u> A2 (1)	6.4/7.0
<u>Th. neapolitanus</u> (1)	7.7/6.3
<u>Th. ferrooxidans</u> (1)	7.5
<u>Th. denitrificans</u> (1)	11.4/10 (eccepteur, NO ₃ ⁻) 14.7 (eccepteur, O ₂)
<u>Paracoccus denitrificans</u> (2)	4.5
<u>Hydrogenobacter</u>	10

(1) Kelly (1982)

(2) Friedrich et Mitrenga (1981)

TABLEAU 24

Caractéristiques différentielles des Hydrogenobacter, de quelques hydrogénobactéries thermophiles et de deux souches de sulfoxydant

	<u>Pseudomonas</u> <u>thermophila</u> (1)	<u>Pseudomonas</u> <u>hydrogenothermophila</u> (1)	<u>Flavobacterium</u> <u>autothermophilum</u> (1)	<u>Bacillus</u> <u>Schlegelii</u> (2)	<u>Thiomicrospira</u> <u>pallophila</u>	<u>Thiobacillus</u> <u>thioarvus</u>	<u>Hydrogenobacter</u> sp.
Mobilité	+	+	-	+	+	+	-
Gra	-	-	-	V	-	-	-
H ₂ -lithotrophie	+	+	+	+	-	-	+
S-lithotrophie	?	?	?	+	+	+	+
Temp. opt (°C)	52	50	50	70	28	28	70
pH opt	7	6,8-7,2	7	6-7	6-8	6,6-7,2	7
Spore	-	-	-	+	-	-	-
Mec. fixation CO ₂	?	?	?	Calvin	Calvin	Calvin	ICA inversé
G + C %	63,5	68	64,9	67,1-67,7	43-44	62-68	38-40

(1) : D'après Kryukov et al. (1983)

(2) : D'après Schunk et Araque (1979)

V : Variable

? : aucun renseignement disponible

TABLEAU 25

Caractéristiques différentielles des Hydrogenobacter et des principaux groupes de bactéries photosynthétiques

	<u>Chromatiaceae</u>	<u>Rhodospirillaceae</u>	<u>Chlorobiaceae</u>	<u>Chloroflexaceae</u>	<u>Hydrogenobacter</u>
Mécanisme de fixation du CO ₂	Calvin	Calvin	TCA inversé (<u>Chl. limicola</u>)	Acétyl CoA (<u>Chl. aurantiacus</u>)	TCA inversé
Thermophilie	rare	rare	rare	+	+
H ₂ -lithotrophie	+	+	+	+	+
S-lithotrophie	+	+	+	+	+
Accumulation de soufre	intracellulaire (sauf <u>Ectothiorodospira</u>)	extracellulaire	extracellulaire	extracellulaire	extracellulaire
Hétérotrophie (en aérobiose)	-	+	-	-	-
G + C %	45-70	61.2-72.4	48.5-58.1	53-54	38-40

TABLEAU 26

Origine des hydrogénobactéries à spore ovale

Souche	Site N°	Temp. (°C)	pH
T2	11	42	2-2,5
T201	20	25	2,5
T202	20	25	2,5
T21	21	45	4,0
T21b	21	45	4,0
T22	11	25	3,5
T22b	11	25	3,5

TABLEAU 27

Sources de carbone et d'énergie des souches à spore ovale

	T2	T201	T202	T21	T21b	T22	T22b
acétate	+	+	+	+	+	+	+
butyrate	+	+	+	+	+	+	+
α -cétoglutarate	+	+	+	+	+	+	+
malate	+	-	+	+	-	+	+
malonate	+	-	+	-	-	+	+
oxaloacétate	+	+	+	+	+	+	+
succinate	+	+	+	+	+	+	+
L-arginine	-	-	-	-	-	-	+
L-asparagine	-	-	+	-	-	-	-
L-aspartate	-	-	-	+	-	+	-
L-glutamate	+	+	+	+	+	+	+
isoleucine	+	-	+	+	+	-	+
valine	+	+	-	-	+	-	-
butanol	+	+	+	+	+	+	+
éthanol	+	-	+	+	-	-	-
phénol	+	+	+	+	+	+	+
propanol	+	-	-	-	-	-	+

TABEAU 28

Localisation de l'hydrogénase de la souche T2 (Bacillus tusciae)
cultivée en conditions H₂-lithotrophes

	Hydrogénase (U/mg)	Malate déshydrogénase (U/mg)
Fraction totale	2,51 (100 %)	0,65 (100 %)
Fraction soluble	0	0,99 (82 %)
Fraction membranaire	4,38 (93,5 %)	0,09 (6,7 %)

TABEAU 29

Analyse des acides gras de la souche T2 (Bacillus tusciae),
composition en %

iso C14 : 0,2	iso C17 : 3,4
iso C15 : 0,3	anteiso C17 : 47
anteiso C15 : 5,2	anteiso C19 : 1,1
n C16 : 2,7	inconnu : 5,5
iso C16 : 28,4	somme des minipics : 4,9

TABEAU 30

Pourcentage d'homologie ADN - ADN entre les diverses souches
d'hydrogénobactéries à spore ovale

	T2	T202	T21	T201	T21b	T22	T22b
T2	100						
T202	90	100					
T21		100	100				
T201	81	63		100			
T21b	67		40	52	100		
T22					100	100	
T22b						100	100

TABLEAU 31

Caractères différentiels entre les souches T2, T201 et d'autres *Bacillus thermophilus*

	T2, T201	<i>B. schlegelii</i> (1)	<i>B. acidocaldarius</i> (2)	B.sp(3)
G + C %	57 - 58	67 - 68	61 - 62	nd
Forme des spores	ovale	ronde	ovale	ovale
Gram	+	variable	variable	+
Flagellation	latérale	pâtricruche	nd	pâtricruche
pH optimal	4,2-4,8	6-7	2-5/6	3,5-4
Temp. optimal (°C)	55	70	65	65
PHB	+	-	-	nd
H2-lithotropie	+	+	-	nd
Sources de carbone et d'énergie				
-ac. organiques (eu moins certains)	+	+	-	+
-sucres (eu moins certains)	-	-	+	+
Hydrolyse de l'amidon	-	-	+	+
Pénicilline G (M.i.c) U/ml	0,04	0,005	nd	nd

nd : non déterminé

(1) : d'après Schlegel et Arengo (1979)

(2) : d'après Darland et Brock (1970)

(3) : d'après Uchino et Doi (1967)

TABLEAU 32

Origine des hydrogénobactéries à spore ronde

Souches	origine géographique
T2-11	San Federigo solfetero, près de Monterotondo Marittimo, prov. Grosseto (Italie)
G3	Geysir champ géothermel (Islands)
He3a et He3b	Eldfell volcan, Heimeey, Vestmen Islands, (Islands)
R2	Air eu-dessus de Neuchâtel (Suisse)
<u>Bacillus schlegelii</u> souche type DSM 2000	Lac "Le Loclat", près de St-Blaise (canton de Neuchâtel, Suisse)

TABLEAU 33

Caractéristiques des hydrogénobactéries à spore ronde

	DSM 2000*	R2	T2-11	He3a	He3b	G3
O + C (%)	64,4	64,4	62,3	63,2	63,8	62,6
Sources de carbone et d'énergie						
galactose	-	-	-	+	-	-
glucose	-	+	+	+	+	-
mannose	-	+	+	+	-	-
acétate	+	+	+	+	+	+
butyrats	+	+	+	+	+	+
α -cétoglutarate	-	+	-	+	+	-
L-malate	+	+	+	+	+	-
oxalate	nd	-	+	-	-	-
oxalosuccinate	nd	+	+	+	+	+
pyruvate	+	+	+	+	+	-
succinate	+	+	+	+	+	-
DL-alanine	+	+	+	+	+	-
cystéine	+	+	-	-	-	+
L-glutamate	+	+	+	+	+	-
D-glutamate	-	+	-	+	-	-
L-phénylalanine	-	-	-	+	-	-
L-proline	+	+	-	+	+	+
n-propanol	+	-	-	-	-	-
phénol	+	-	+	+	+	-
Sources d'azote						
ammonium	+	+	+	+	+	+
nitrate	-	-	-	-	-	-
nitrite	+	-	-	+	+	+
urée	+	+	+	+	+	+
Croissance avec 3% NaCl	-	-	-	-	-	-
Croissance avec 1% glycine	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-	-	-	-
Réduction des nitrates	NO ₂ ⁻	-	NO ₂ ⁻	-	-	-
Penicilline G (M.i.c.) U/ml	0,005	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Croissance à 80°C	-	-	-	-	-	-
Croissance à 37°C	-	-	-	-	-	-

* : d'après Schenk et Aragno (1979) sauf pour le pourcentage C + C
nd : non déterminé

TABLEAU 34

Pourcentage d'homologie ADN - ADN des diverses souches d'hydrogénobactéries à spore ronde

	DSM 2000	R2	T2-11	He3e	He3b	G3
DSM 2000	100					
R2	93	100				
T2-11	88	91	100			
He3e	78			100		
He3b	88				100	
G3	90				81	100

TABLEAU 35

Minime et maxime de croissance de divers Bacillus

	Temp. min. (°C)	Temp. max. (°C)
<u>B. tusciae</u>	45	60-65
<u>B. schlegelii</u>	50	75
<u>B. acidocaldarius</u>	45	70
<u>B. steerothermophilus</u>	30-45	65-75
<u>B. licheniformis</u>	15	50-55
<u>B. circulans</u>	5-20	35-50
<u>B. coagulans</u>	15-25	55-80

Annexe :
figures 1 - 23

Figure 1

Localisation des points de prélèvement en Italie



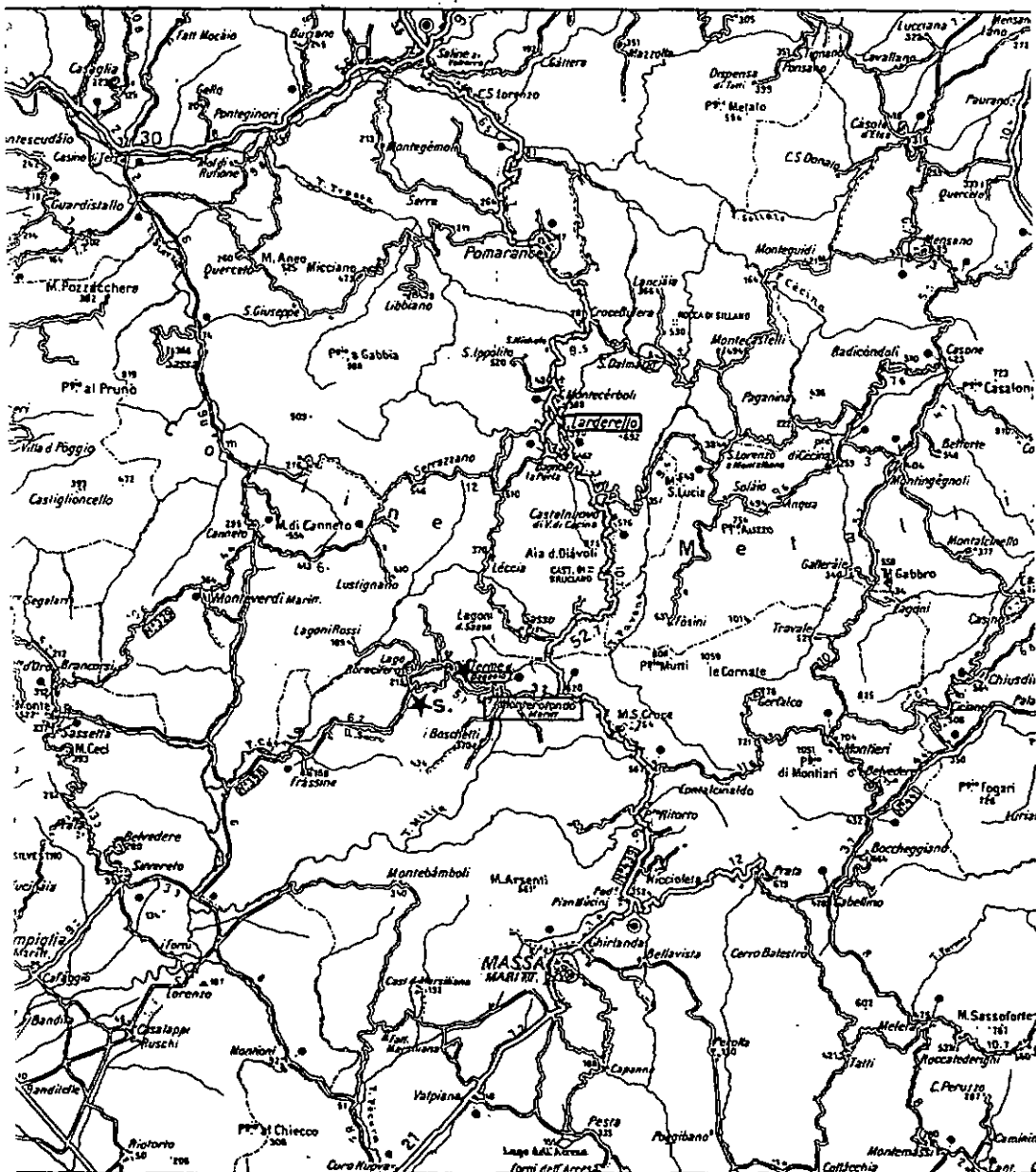
Figure 2

Localisation de la zone géothermale de Larderello



Figure 3

Localisation de le solfetere de San Federigo



S: solfetere de San Federigo

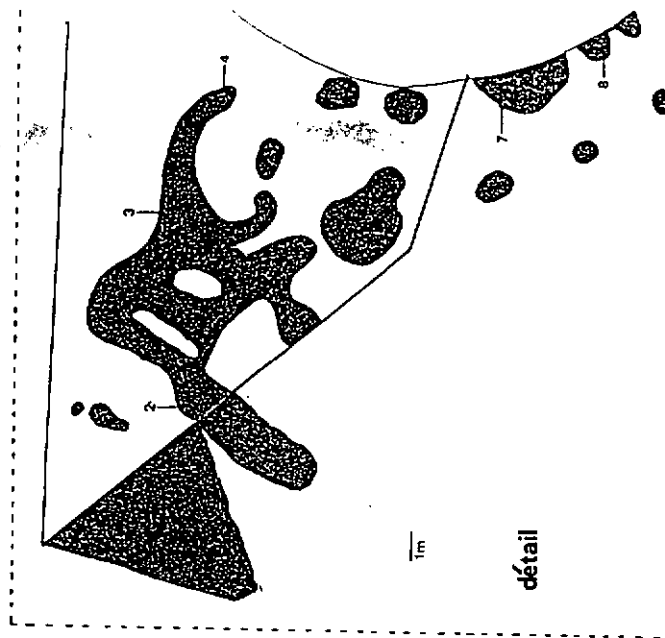
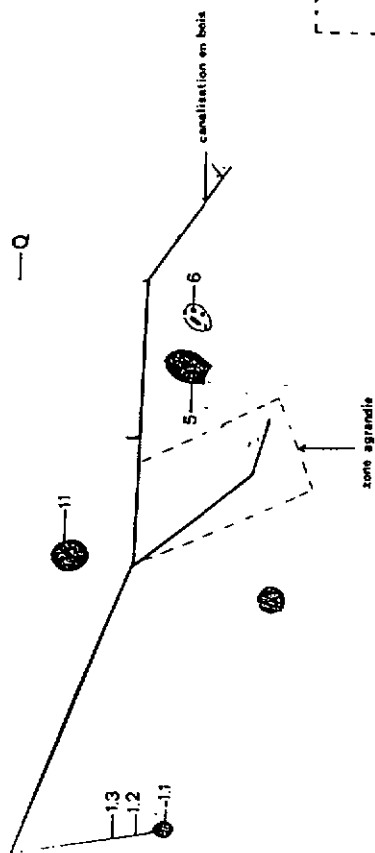
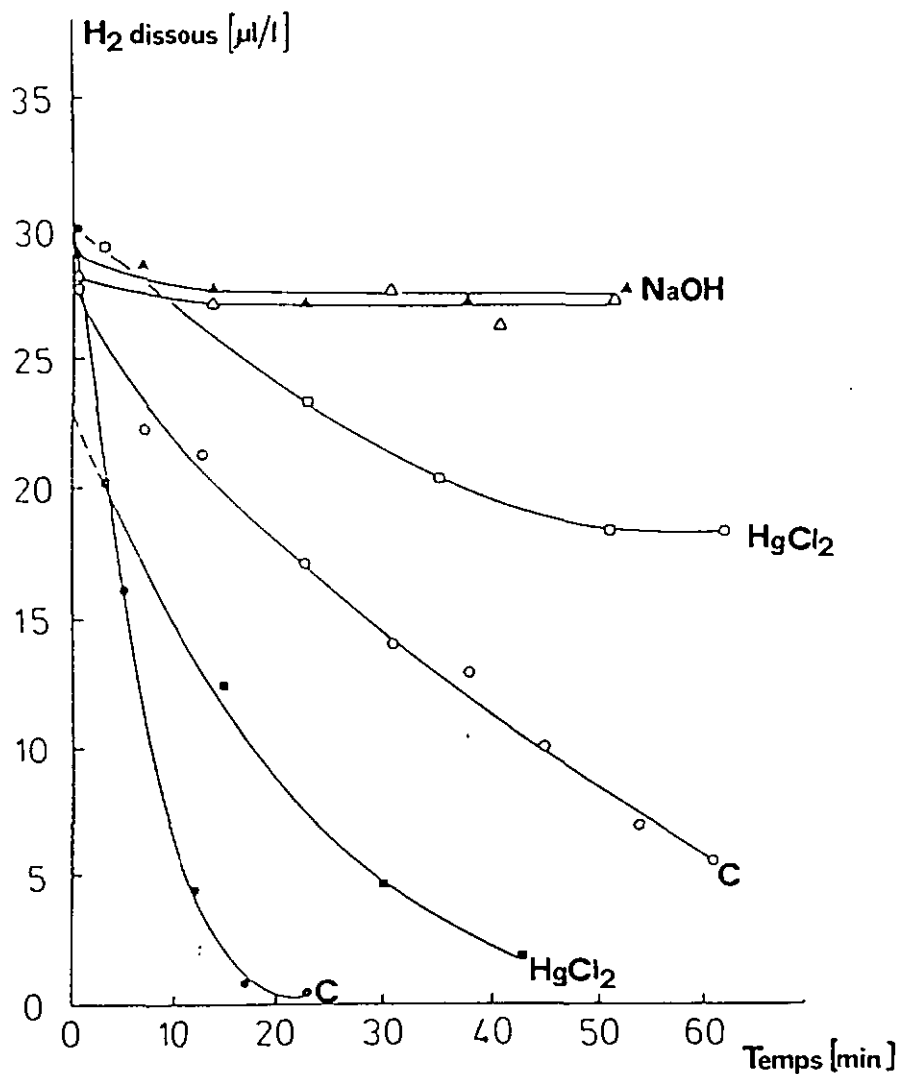


Figure 4
Localisation des points d'échantillonnage
de la sulfatere de San Federigo

Figure 5

Consommation d'hydrogène dans les eaux géothermales
du site 9 (Fig. 4), incubées à 60°C



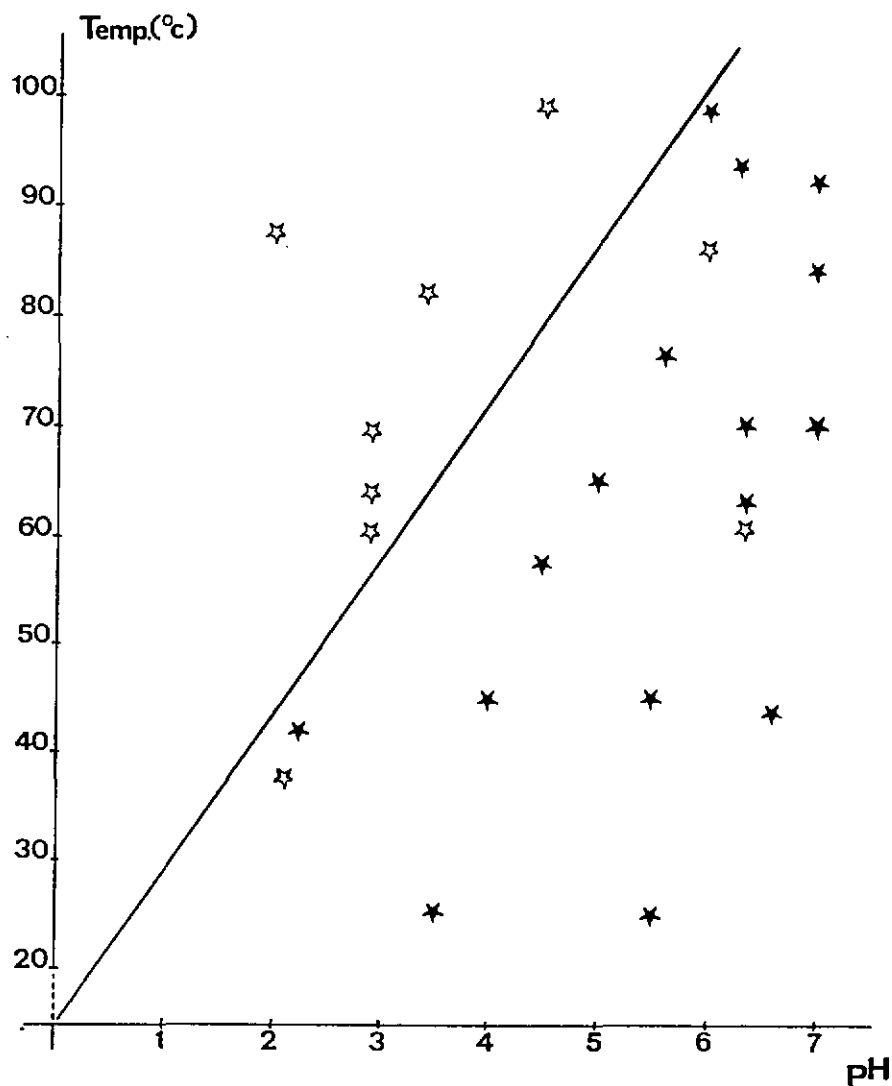
$\blacktriangle \blacksquare \bullet$: anaérobie

$\triangle \square \circ$: aérobie

C : contrôle

Figure 6

Evolution des enrichissements effectués à Sen Federigo en
fonction des conditions de pH et de température



★ : Isolement d'hydrogénobactéries possible

☆ : Pas d'hydrogénobactéries isolées

Figure 7 : Localisation des points de prélèvement de la région de Naples



Figure 8 : Localisation des points de prélèvement en Islande

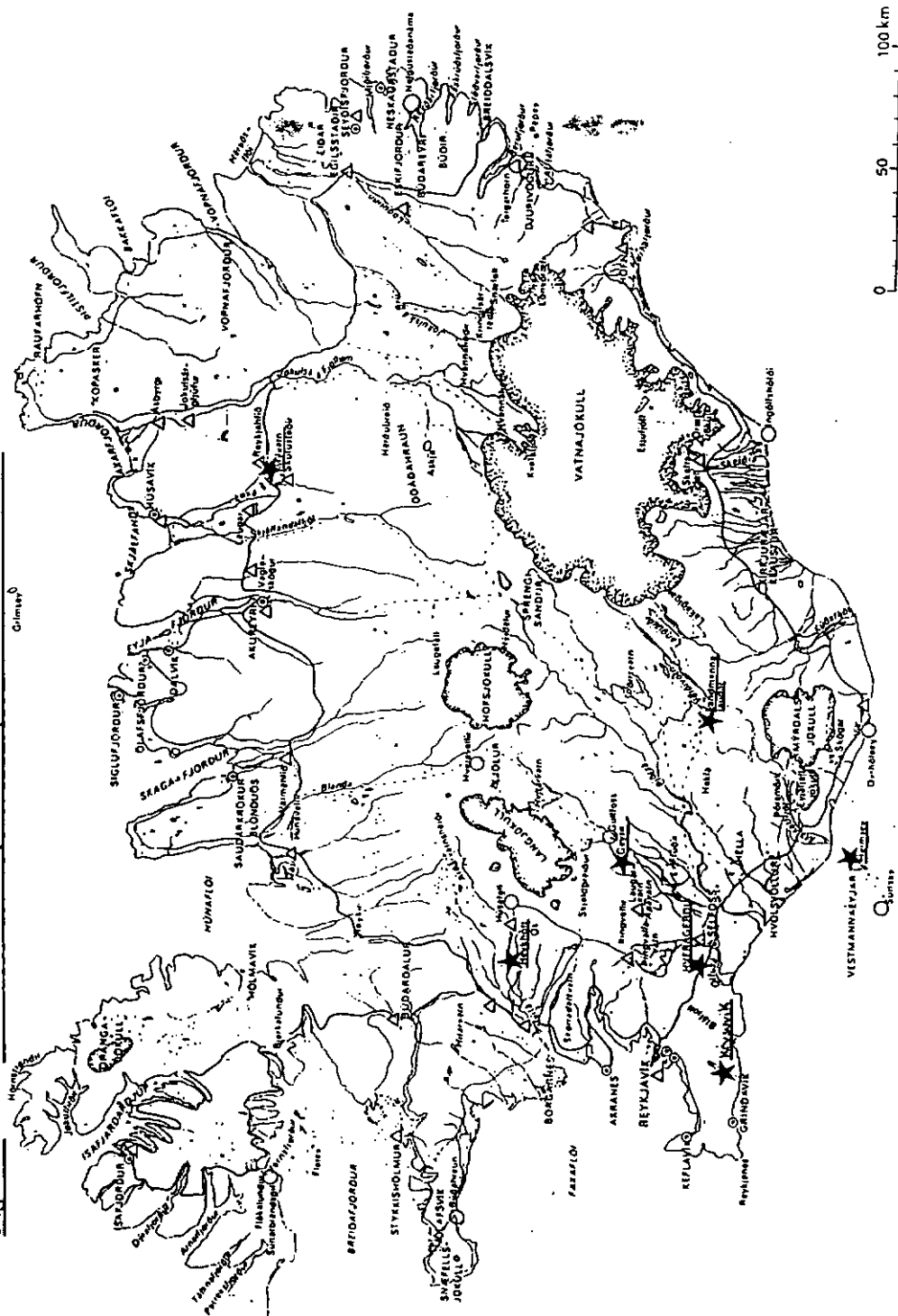


Figure 9

Distribution géographique des Hydrogenobacter



Figure 10

Dendogramme basé sur les homologies ADN-ADN des Hydrogenobacter, données dans le tableau 13.

L'échelle indique les pourcentages d'homologie

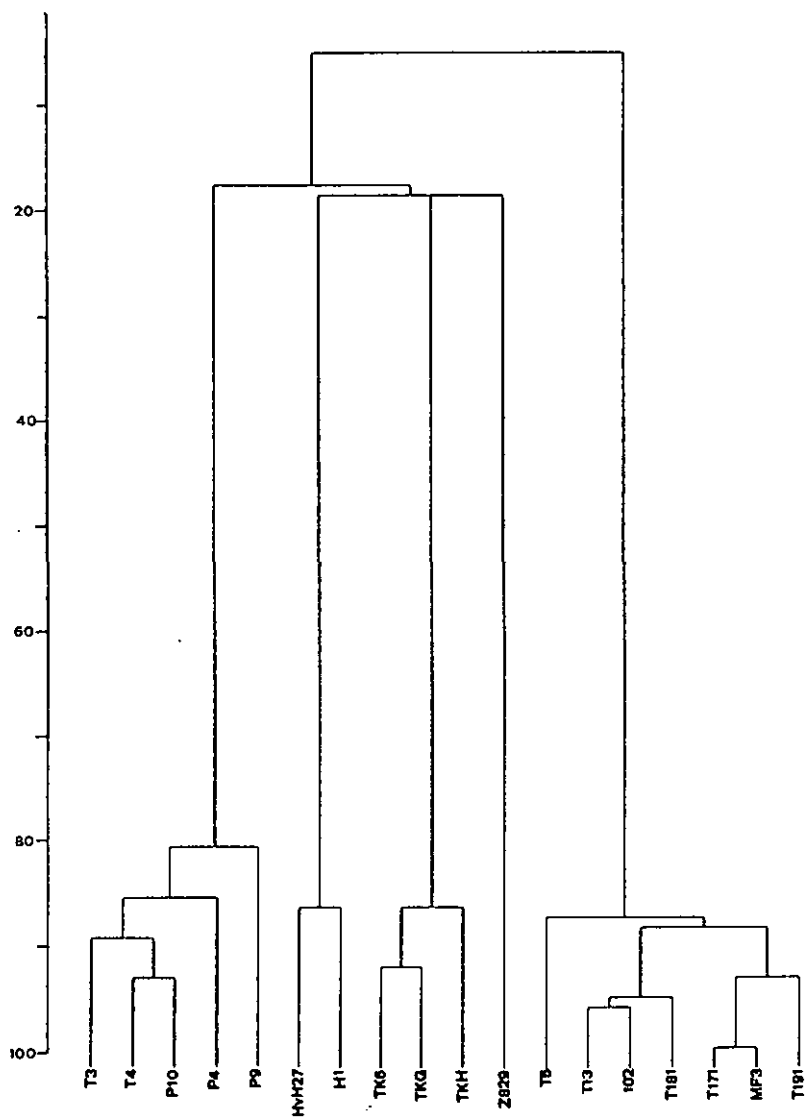


Figure 11

Croissance de la souche T3 en conditions H₂-lithotrophes

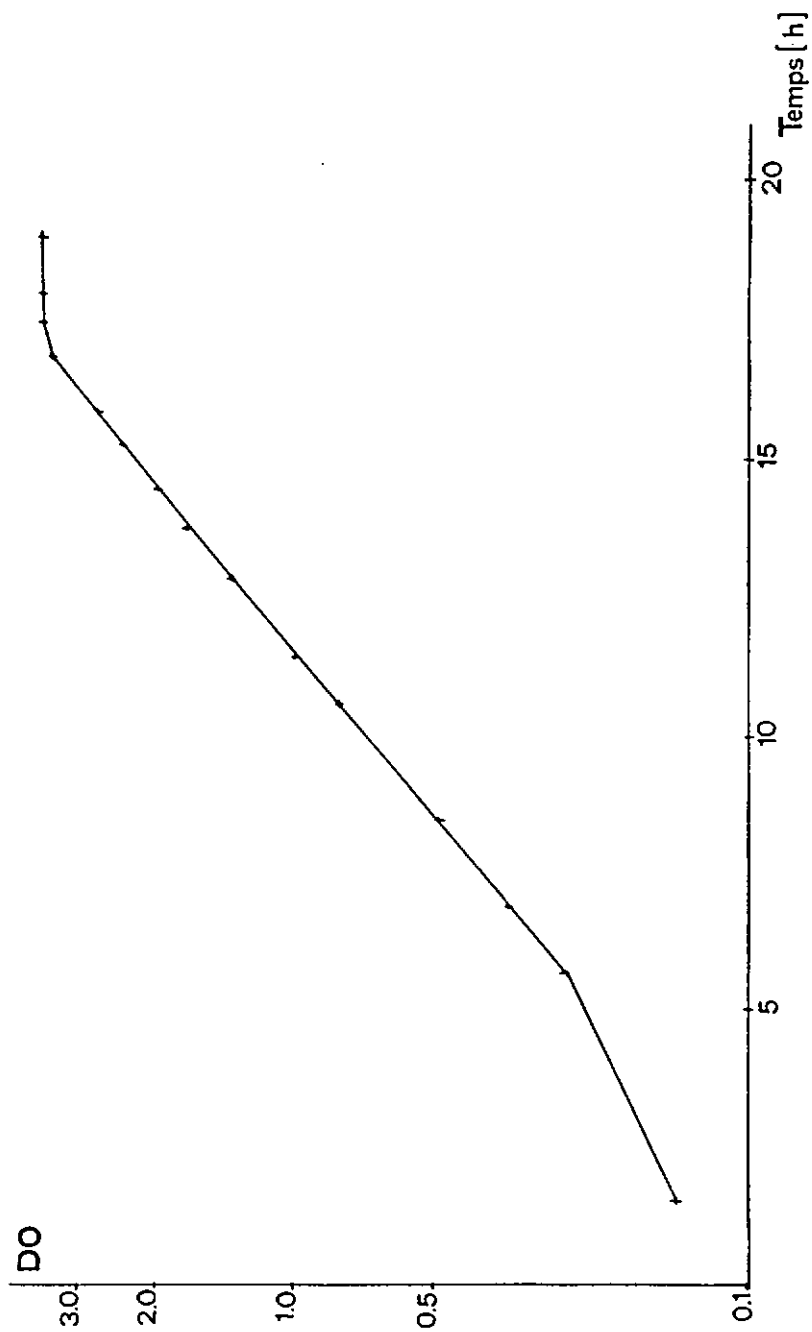


Figura 12

Optimum da température de la souche P10 (Hydrogenobacter),
cultivée en conditiona H₂-lithotrophes dans un incubateur
à gradient de température

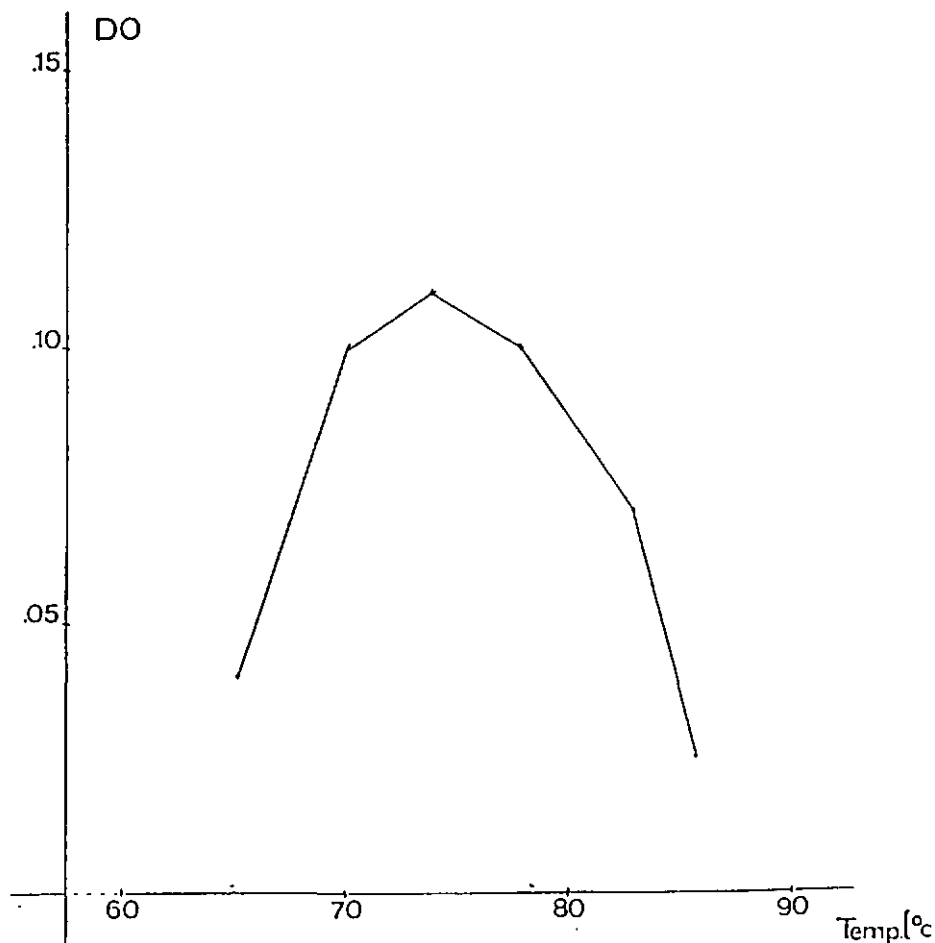


Figure 13

Optimum de pH de la souche MF3 (Hydrogenobacter) cultivée
en conditions hétérotrophes

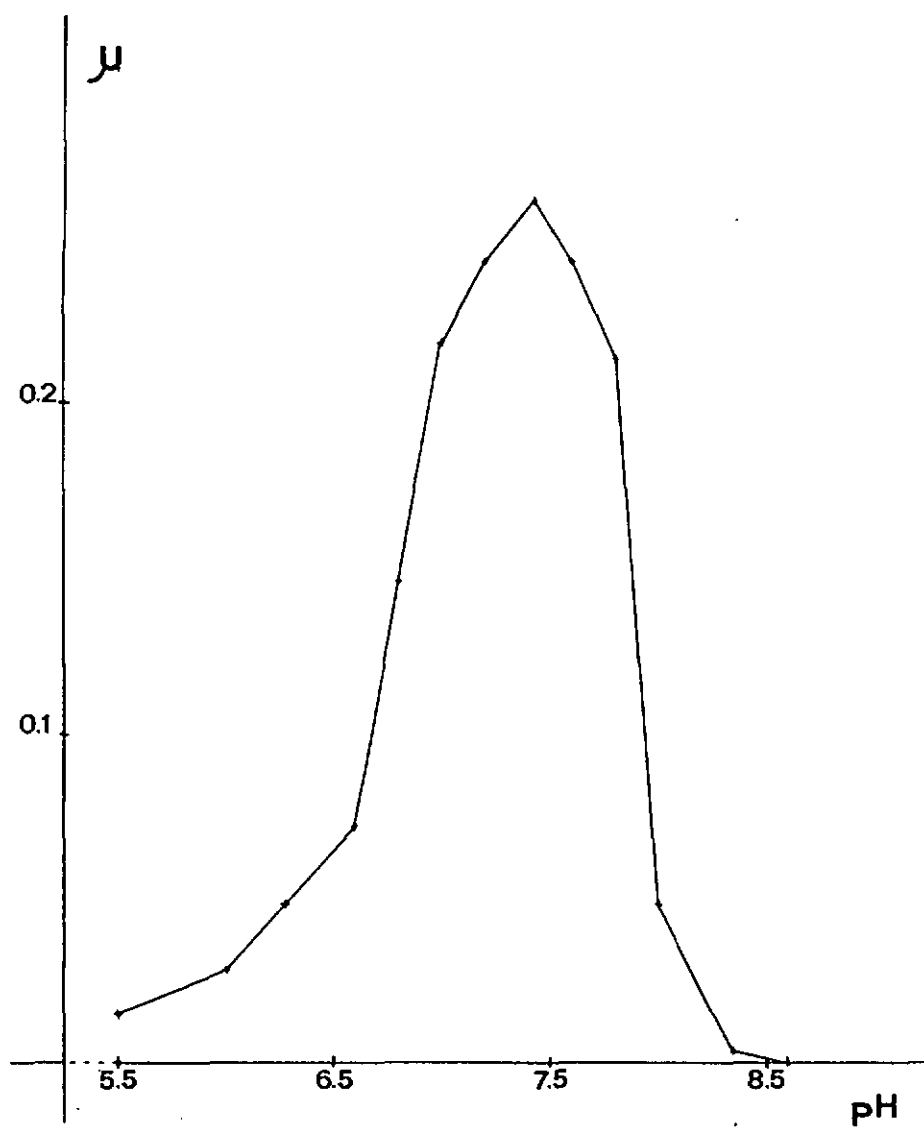
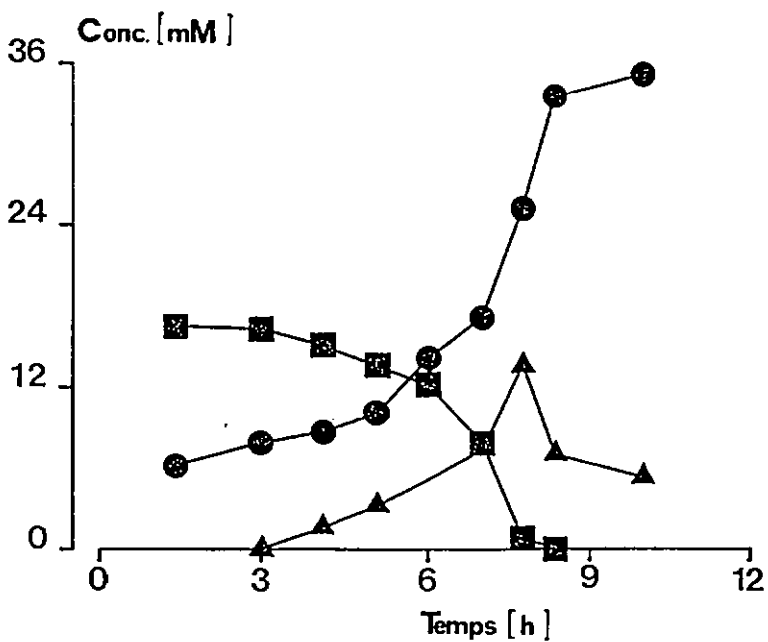
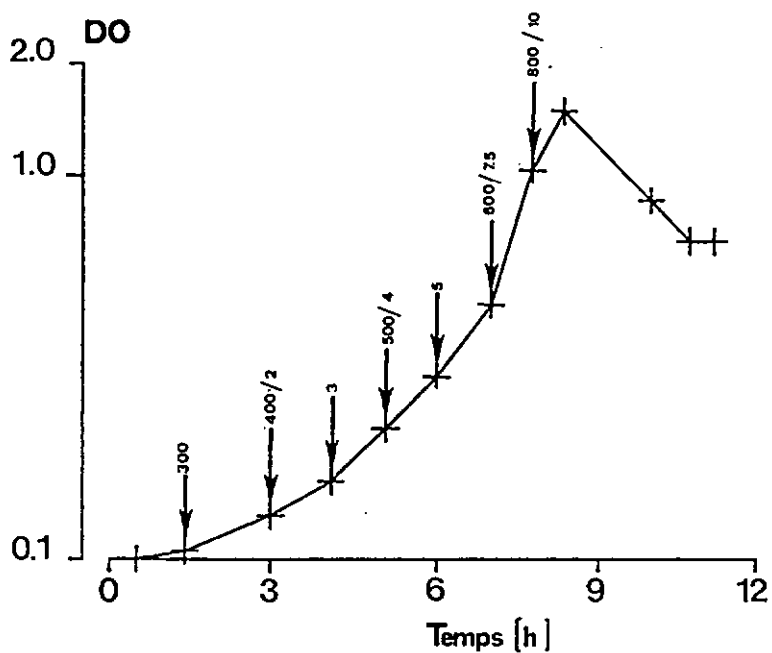


Figure 14

Croissance de la souche T3 en conditions lithotropes (thiosulfate)



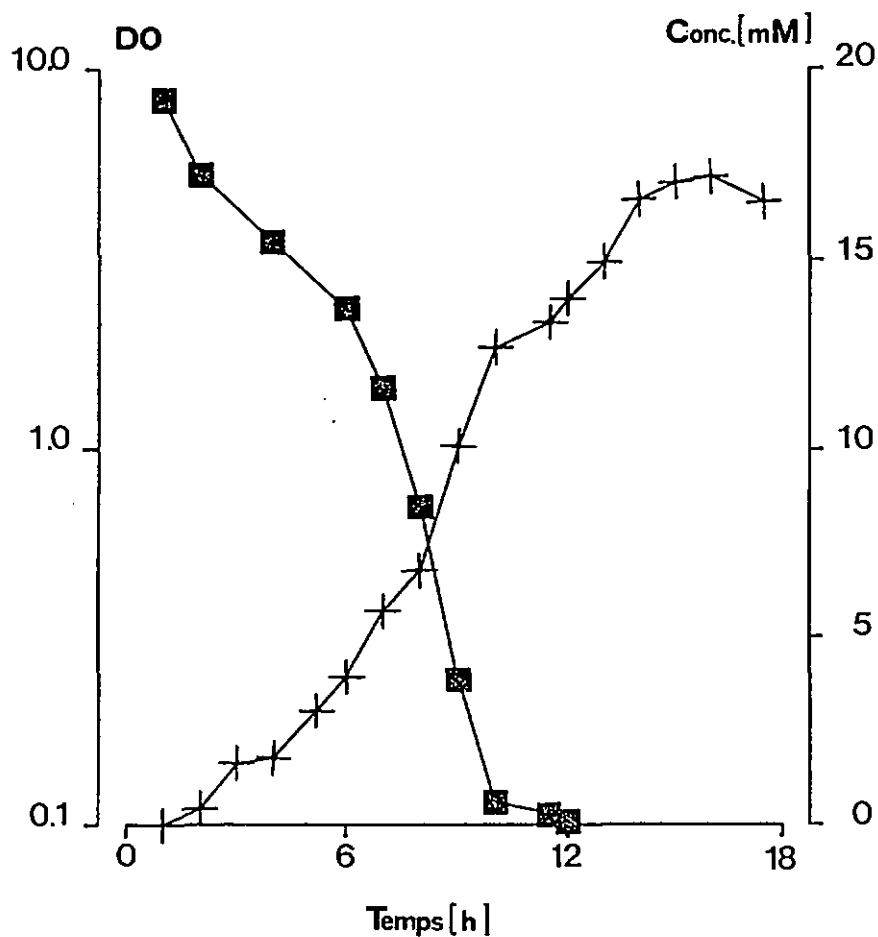
Légende de la Figure 14

- + : densité optique
- : concentration en thiosulfate
- : concentration en sulfate
- ▲ : concentration en soufre

Les flèches signalent les ajustements de la vitesse d'agitation (rpm) ou de la concentration en oxygène dans la phase gazeuse (%).

Figure 15

Croissance de la souche T3 en conditions mixolithotrophes
(thiosulfate et hydrogène)



■ : concentration en thiosulfate

+ : densité optique

Figure 16

Activité de l'hydrogenese en fonction de la température

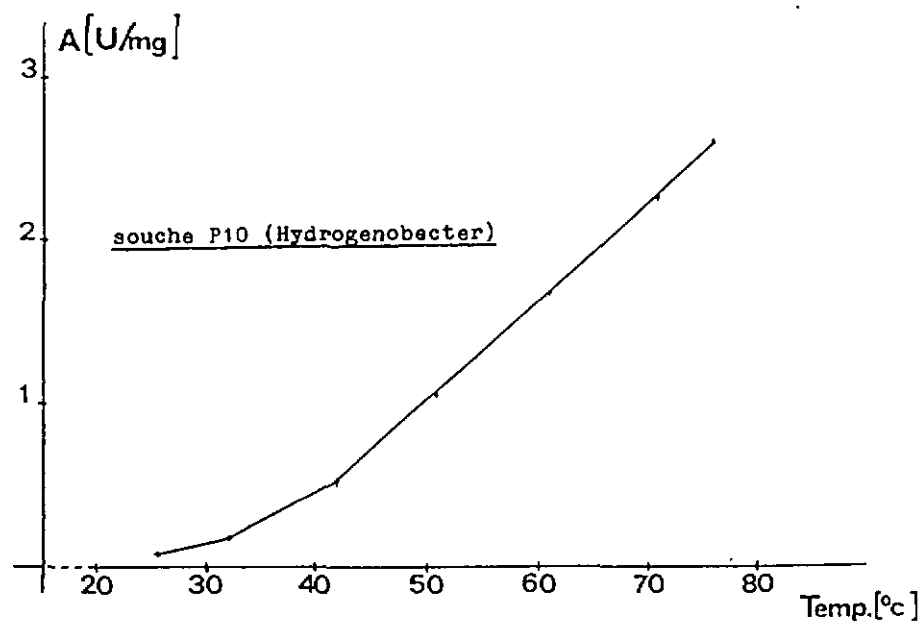
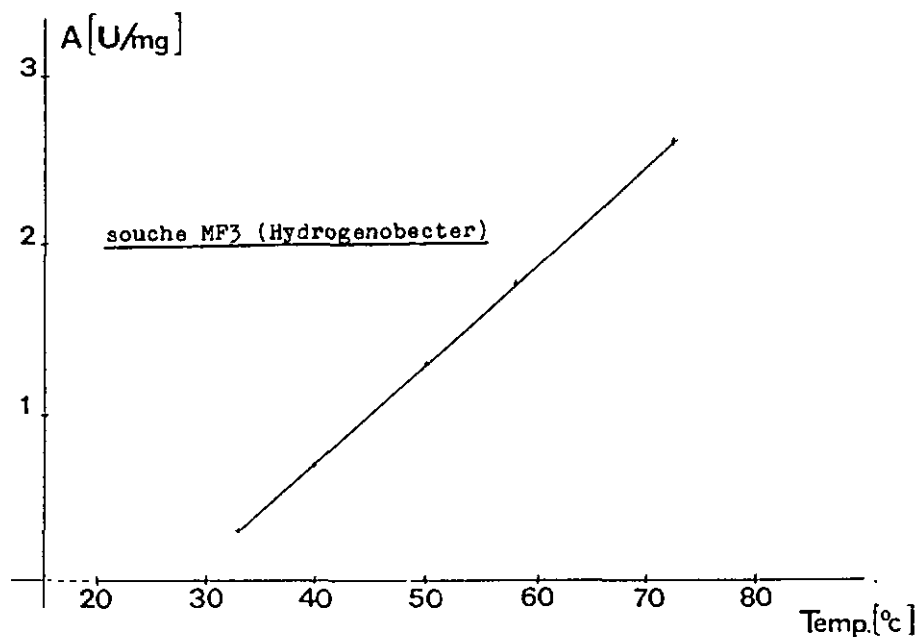
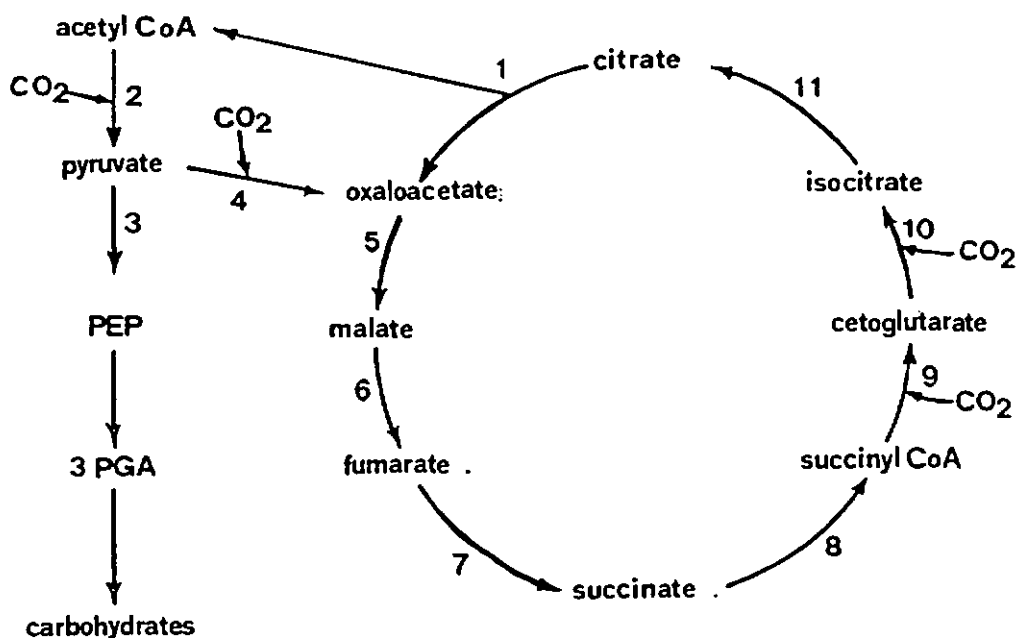


Figura 17

Mécanisme de fixation du CO₂ chez les Hydrogenobacter



- 1 : ATP citrate lyase
- 2 : Pyruvate synthase
- 3 : Phosphoenolpyruvate synthase
- 4 : Pyruvate carboxylase
- 5 : Malate dehydrogenase
- 6 : Fumarase
- 7 : Fumarate reductase
- 8 : Succinyl CoA synthetase
- 9 : α-ketoglutarate synthase
- 10 : Isocitrate dehydrogenase
- 11 : Aconitase

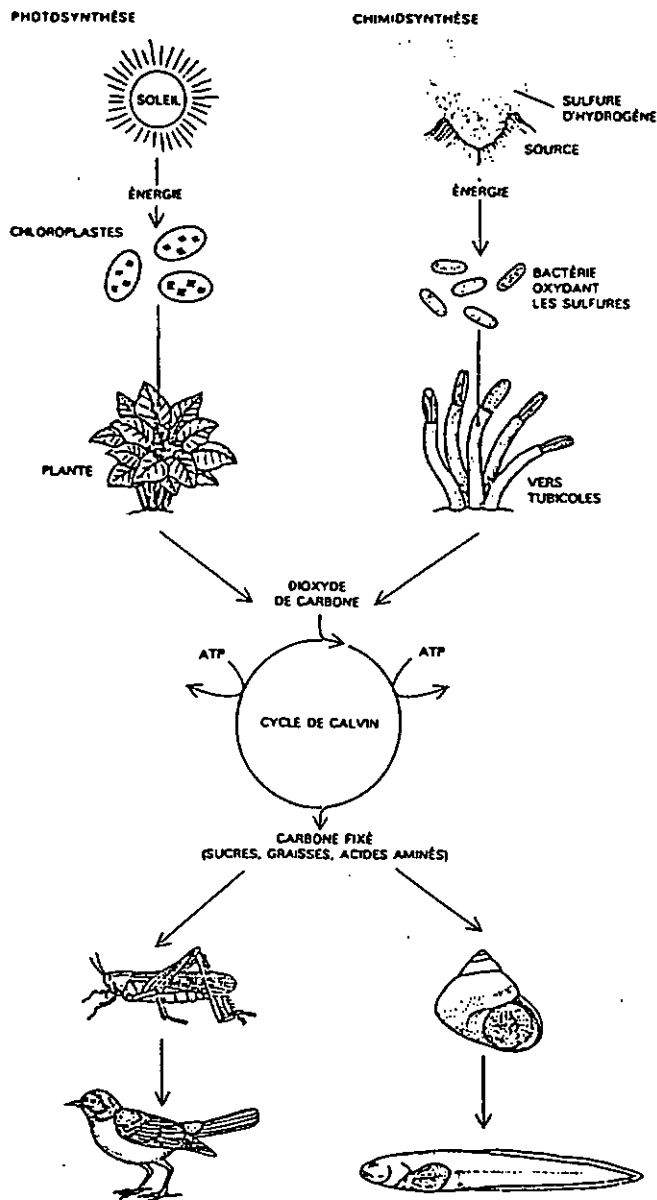
PEP : Phosphoenolpyruvate

PGA : Acide 3-phosphoglycérique

Figura 18

Comparaison entre chimio- et photosynthèse

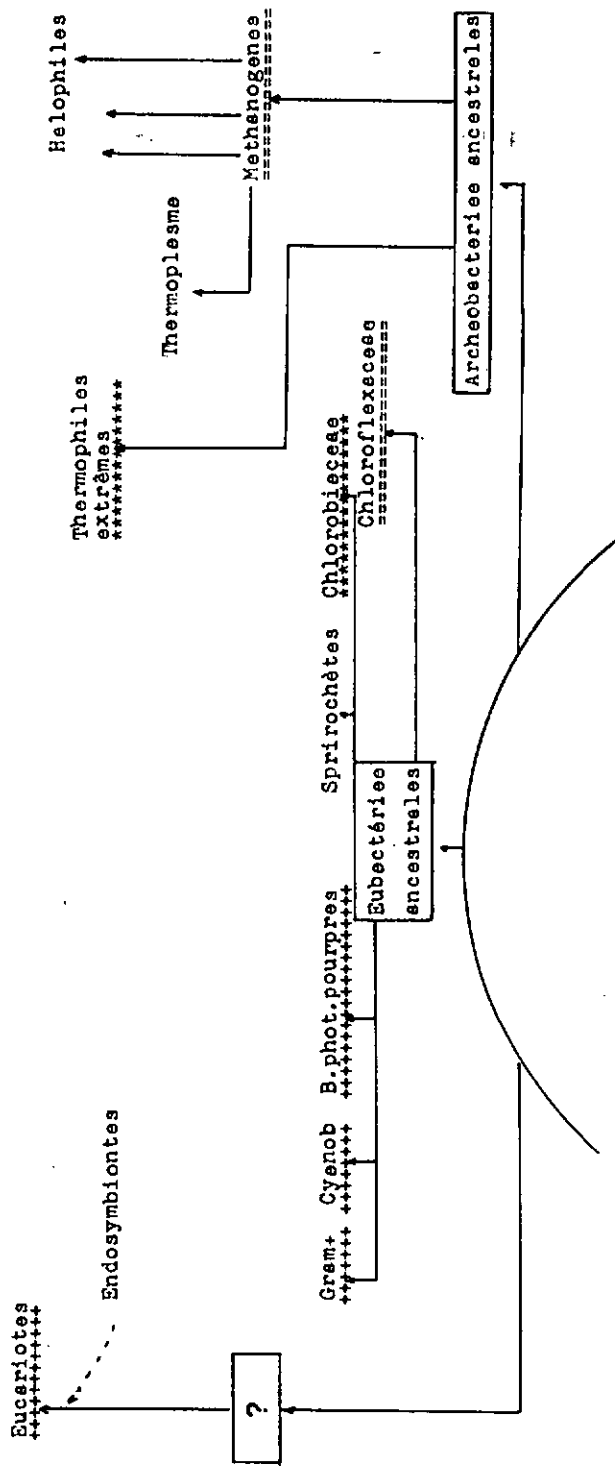
D'après Childress et al. (1987)



LA PHOTOSYNTHESE ET LA CHIMIOSYNTHESE : les sources d'énergie diffèrent, mais le processus de transformation et les produits finaux sont les mêmes. Dans la photosynthèse, la lumière est absorbée par les chloroplastes de la plante et le carbone se fixe grâce au cycle de Calvin; ce processus libère des sucres, des matières grasses et des acides aminés qui sont incorporés dans la chaîne alimentaire, des herbivores jusqu'aux carnivores. Dans la chimiosynthèse, l'énergie est fournie par le sulfure d'hydrogène qui s'échappe des sources du fond océanique. Il est absorbé par des bactéries libres et par le ver tubicole, par exemple : le sulfure est transporté jusqu'aux bactéries endosymbiotiques, où il est oxydé et fournit l'énergie nécessaire au cycle de Calvin. Les produits finaux entrent alors dans la chaîne alimentaire, passant directement de carnivores d'ordre inférieur à ceux d'ordre supérieur.

Figure 19

Arbre phylogénique simplifié montrant la distribution des différentes voies de fixation du CO₂



+++ Fixation par le cycle de Calvin

*** Fixation par le cycle tricarboxylique inversé

--- Fixation par la voie de l'acétyl CoA

Figure 20

Optimum de pH de la souche T2 (*Bacillus tusciae*),
cultivée en conditions H₂-lithotrophes

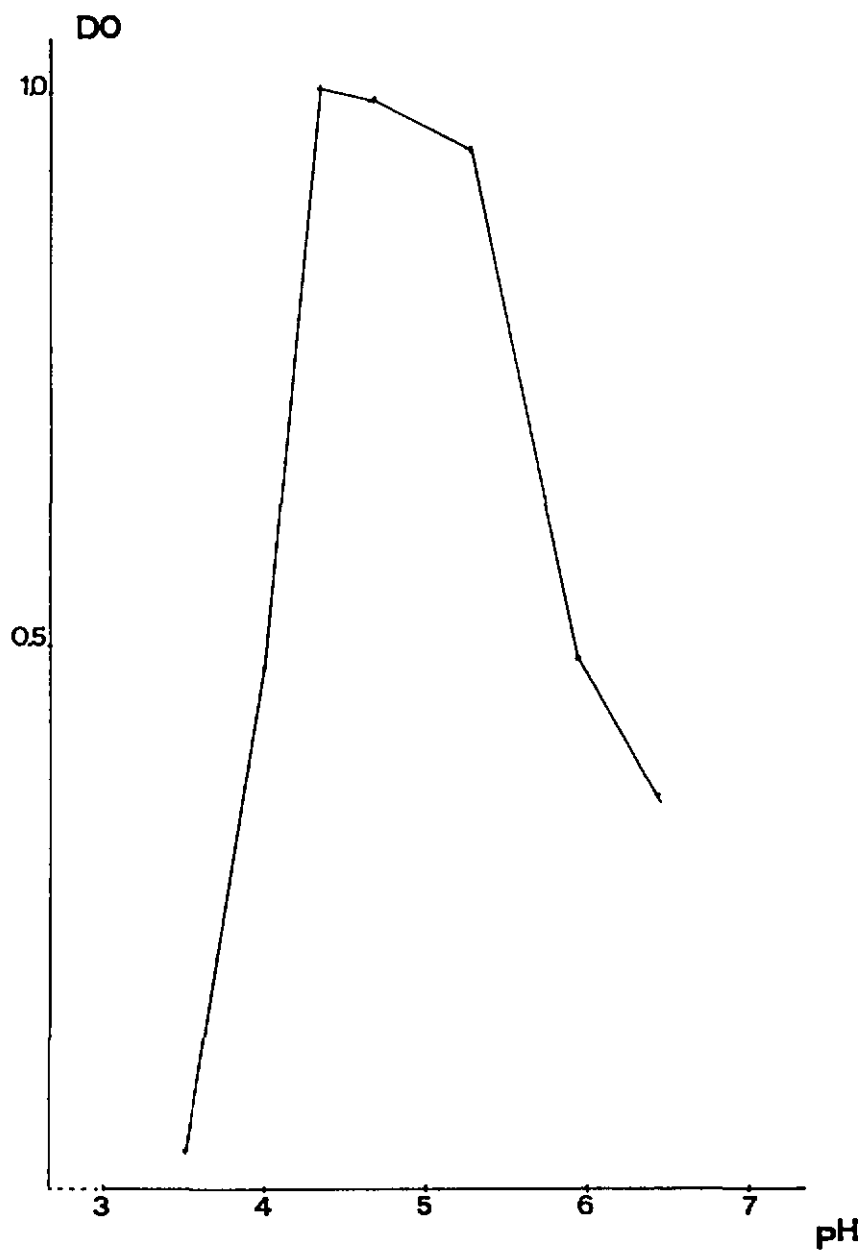


Figure 21

Courbe de croissance de la souche T2 (*Bacillus tusciae*)
en conditions H₂-lithotrophes

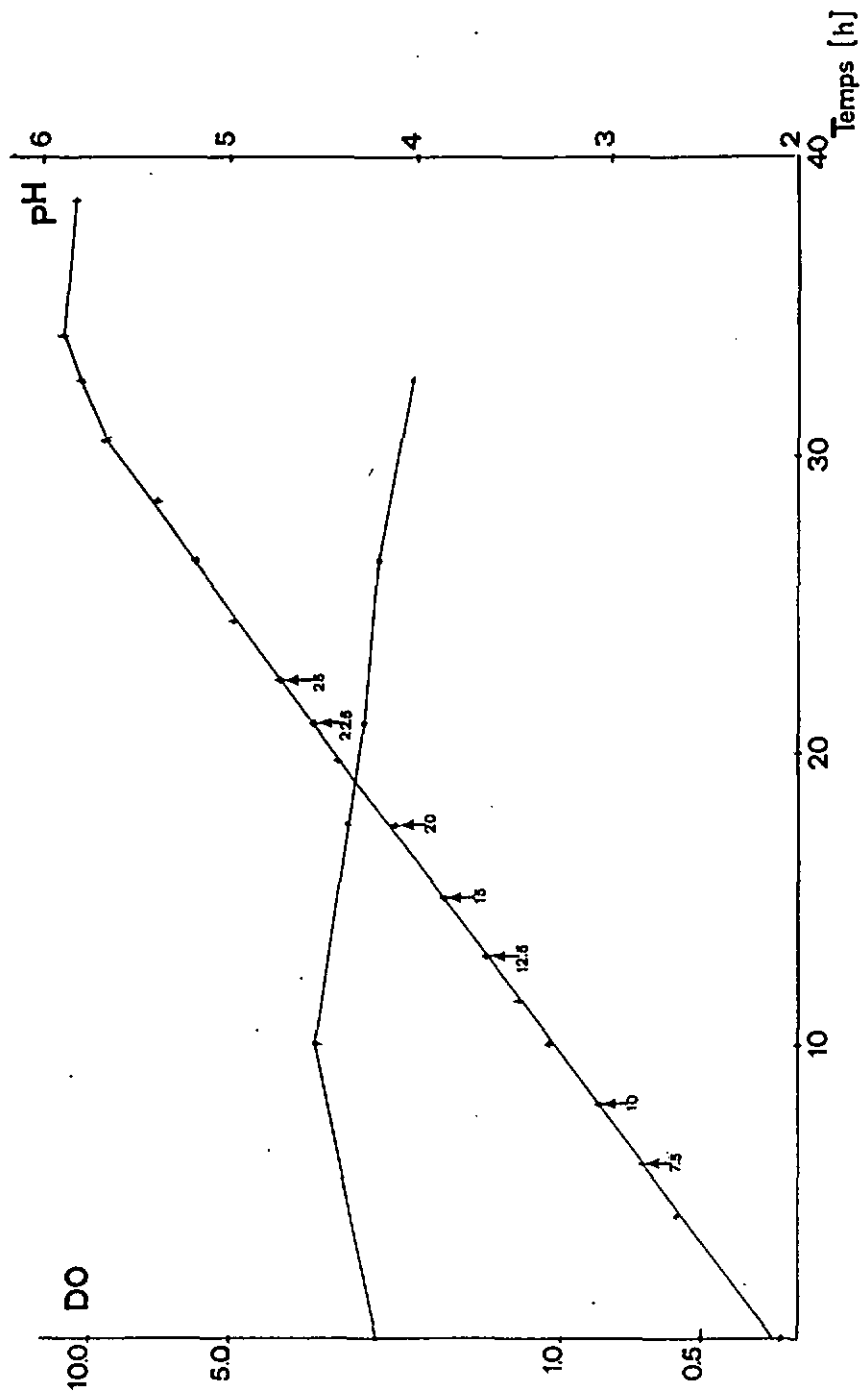


Figure 22

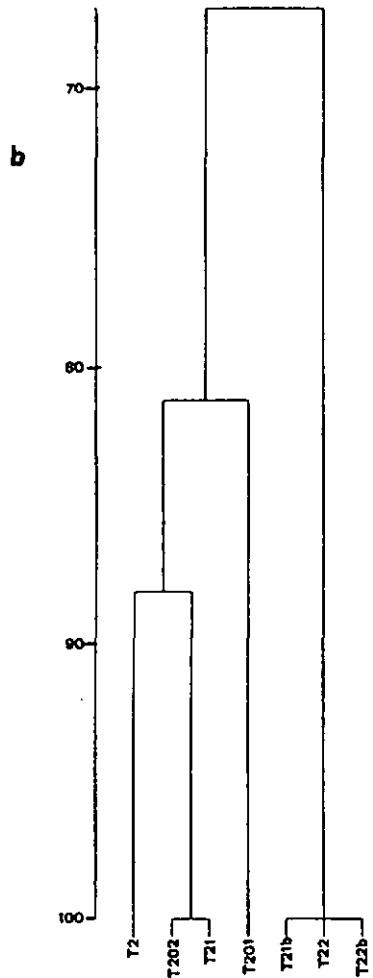
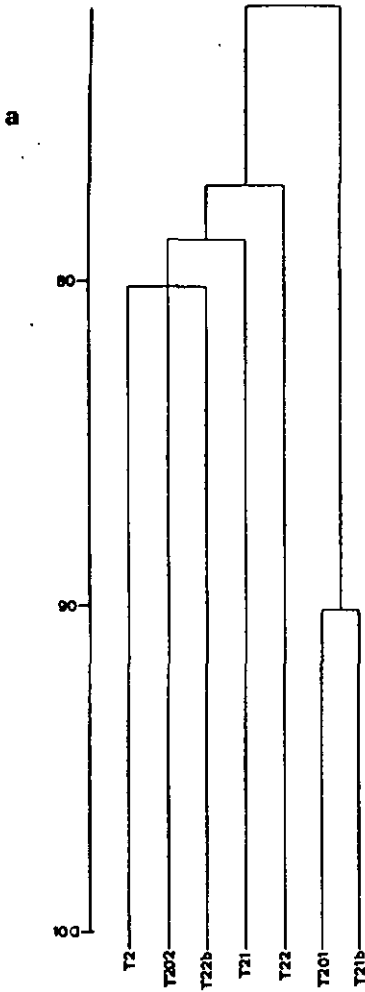
Dendogramme basé sur

a) les caractéristiques phénotypiques
données dans le tableau 27 (distance
de Sorgel)

b) les homologues ADN-ADN données dans
le tableau 30

des hydrogénobactéries à spore ovale,
Bacillus tusciae.

L'échelle indique les % d'homologie.



a

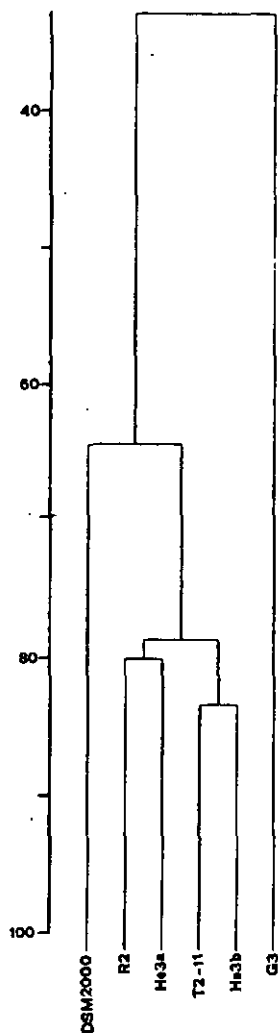


Figure 23

Dendrogramme basé sur

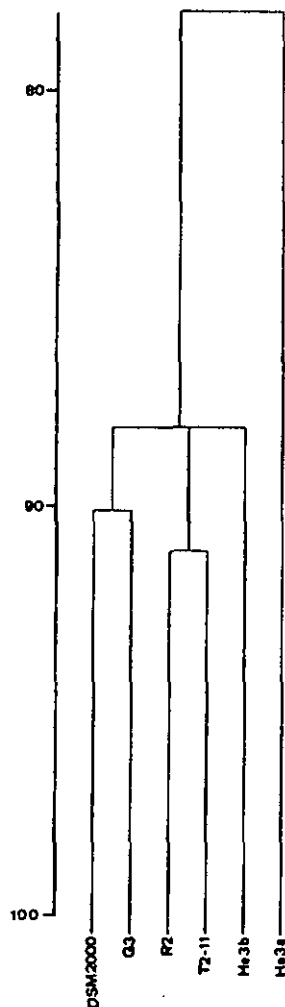
a) les caractéristiques phénotypiques
données dans le tableau 33 (distance
de Sorgel)

b) les homologues ADN-ADN données dans
le tableau 34

des hydrogénobactéries à spore ronde,
Bacillus schlegelii.

L'échelle indique les % d'homologie

b



Annexe :
photos 1 - 14

Photo 1

Prélèvement d'un échantillon de gaz au-dessus du site 3





Photo 2

Site 1.1

Photo 3

Site 2 et 3



Photo 4

Site 5

Photo 5

Site 4



Photo 6

Site 6





Photo 7

Site 7 et 8



Photo 8

Site "Q"

Photo 9

Lago



Photo 10

Hydrogenobacter, souche T3 : contraste de phase

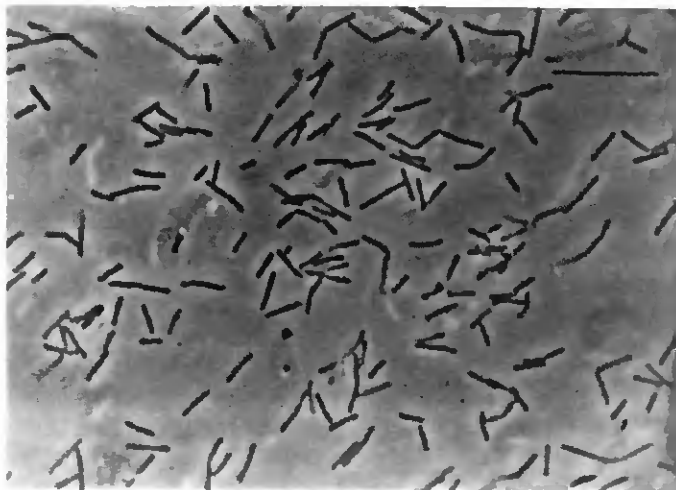
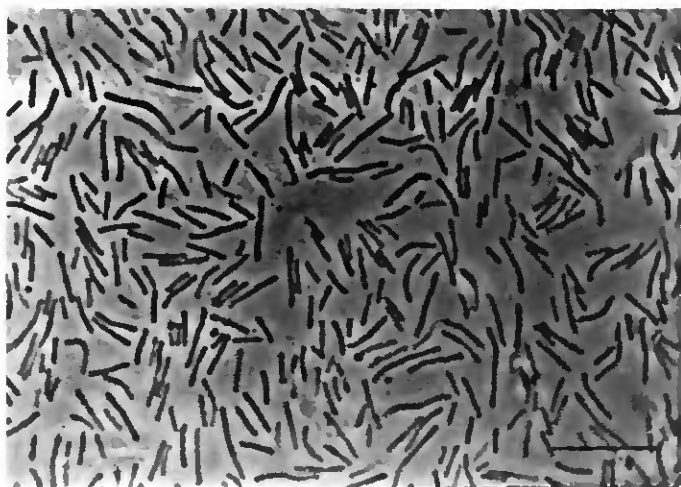


Photo 11

Hydrogenobacter, souche T13 : contraste de phase



Le trait représente 10 μm

Photo 12

Hydrogenobacter, souche MF3 : coupe, x 120.000



- a : membrane cytoplasmique
- b : couche de peptidoglycane
- c : membrane externe

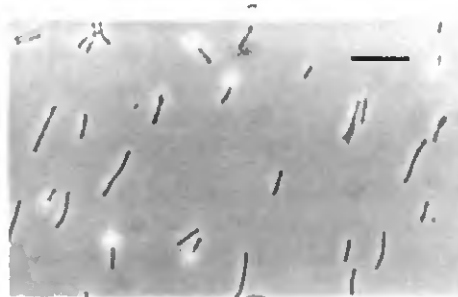
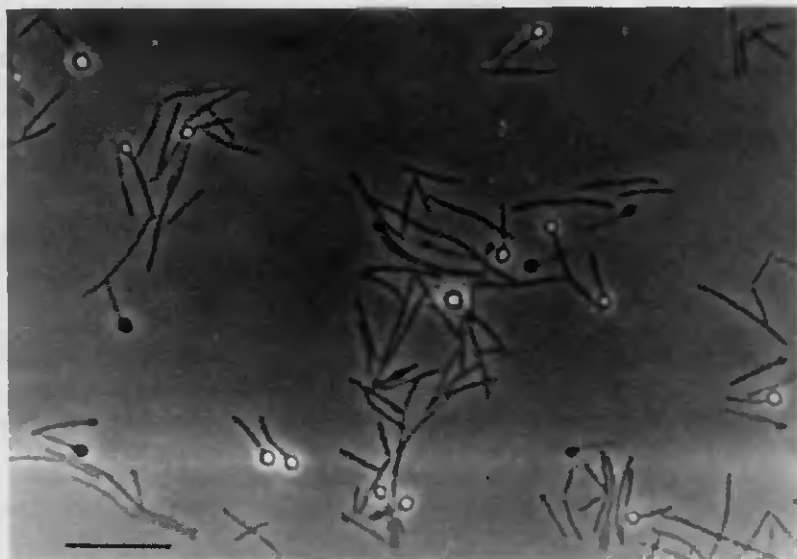


Photo 13

Bacillus tuscias, souche T2 : contraste de phase

Le trait représente 10 μ m

Photo 14



Bacillus schlegelii, souche R2 : contraste de phase

Le trait représente 10 μ m